



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

CARACTERIZAÇÃO DE QUADROS CLÍNICOS DE ESGANA CANINA NO SURTO  
EPIDÉMICO DE 2015-2018 NA ÁREA METROPOLITANA DE LISBOA

TIAGO MANUEL PAIVA LOPES SÃO JOÃO

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luís Manuel Morgado  
Tavares

Doutor Virgílio da Silva Almeida

Doutora Maria Isabel Ferreira  
Neto da Cunha Fonseca

ORIENTADOR

Doutor Virgílio da Silva Almeida

CORIENTADOR

Doutora Solange Judite Roque  
Coelho Alves Gil

2019

LISBOA

---





UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

CARACTERIZAÇÃO DE QUADROS CLÍNICOS DE ESGANA CANINA NO SURTO  
EPIDÉMICO DE 2015-2018 NA ÁREA METROPOLITANA DE LISBOA

TIAGO MANUEL PAIVA LOPES SÃO JOÃO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luís Manuel Morgado  
Tavares

Doutor Virgílio da Silva Almeida

Doutora Maria Isabel Ferreira  
Neto da Cunha Fonseca

ORIENTADOR

Doutor Virgílio da Silva Almeida

CORIENTADOR

Doutora Solange Judite Roque  
Coelho Alves Gil

2019

LISBOA

---

Aos meus pais e à minha ilha, Faial.



## **Agradecimentos**

Aos meus pais, Manuel Humberto e Aida, por todos os valores que me transmitiram ao longo da vida, por todo o amor e carinho e por todas as oportunidades que me deram.

À minha família, por todo o apoio, por todas as experiências e por me fazerem crescer feliz.

A todos os meus amigos do Faial, em especial, André Campos, João Gonçalves e Pedro Simas, por todos os momentos que vivemos na capital, obrigado por todos os conselhos, pelas palavras duras nos momentos da verdade e pelos ombros nos momentos de tristeza.

Aos meus amigos, Manuel e João, por me fazerem crescer como pessoa, pelas palavras de amizade e por me fazerem “acordar” em certas situações. Sem vós esta viagem académica não tinha o mesmo sabor. Ao Guilherme Silva, por ser uma pessoa mais recente na minha vida, mas que considero um amigo de longa data.

Aos meus colegas de 2010, que como eu entraram nos Preparatórios do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária na Universidade dos Açores, crescendo como pessoas ao longo desta jornada, obrigado pelo vosso apoio quer académico quer pessoal; aonde quer que a vida nos leve, as memórias vão sempre me fazer sorrir.

Aos caloiros de 2011, por momentos de alegria e em especial ao Francisco Costa e ao António Mestre, por toda a amizade.

Ao Carlos Silva e ao Bruno Guerreiro por aquelas longas tardes, obrigado pelos bons momentos.

Ao Professor Virgílio Almeida por toda a ajuda e apoio na redação desta dissertação para que fosse a melhor que possível e à Professora Solange Gil pelos momentos de confiança, por me transmitir os seus conhecimentos e pela amizade.

A toda a equipa do Hospital Escolar Veterinário, clínicos, enfermeiros e auxiliares por me fazerem aproveitar ao máximo o estágio curricular.

A todas as pessoas com quem partilhei momentos ao longo deste percurso, por todos os sorrisos, abraços e momentos.

## Resumo

### **Caracterização de quadros clínicos de esgana canina no surto epidémico de 2015-2018 na Área Metropolitana de Lisboa**

A esgana canina é causada por um morbilivírus (CDV), sendo uma das doenças infecciosas mais graves do cão doméstico. O decurso da doença é rápido e a taxa de sobrevivência é baixa se o animal não for hospitalizado e sujeito a cuidados veterinários. Um programa de vacinação adequado pode prevenir a infeção a nível individual e controlar a doença numa população.

Neste estudo foram investigados 49 casos de esgana canina registados na Unidade de Isolamento de Doenças Infecciosas do Hospital Escolar Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária. Foram analisadas as seguintes variáveis: localização geográfica, sexo, idade, raça, sinais clínicos, duração do internamento, estado vacinal, taxa de sobrevivência, frequência mensal da doença, métodos de diagnóstico laboratorial e análises clínicas.

O principal objetivo do estudo foi caracterizar a apresentação clínica dos casos de esgana canina registados durante o foco epidémico ocorrido em 2015 na Zona Metropolitana de Lisboa, e que se manteve ativo até 2018. Não foram evidenciadas diferenças estatisticamente significativas entre as variáveis analisadas e a confirmação de doença. O período de dezembro a março foi quando se diagnosticaram mais casos. Os sinais clínicos mais frequentes foram mioclonias (42,9%), prostração (38,8%), corrimento ocular-nasal (34,7%), sintomas gastrointestinais como vômito e diarreia (24,5%) e tosse (22,4%). A duração média de internamento foi de 4,6 dias e a taxa de sobrevivência de 55,1%. As análises clínicas confirmaram alterações a nível do hematócrito (44,8%), neutrofilia (31,0%), neutropénia (3,4%), linfocitose (6,9%), linfopénia (20,7%), monocitose (27,6%), monocitopénia (10,3%), eosinopénia (55,2%) e eosinofilia (3,4%). Apenas 16,2% (6/37) dos cães infetados, tinham um plano de vacinação completo contra o CDV, o que reforça a necessidade de melhorar a comunicação com os tutores dos cães sobre a importância do cumprimento rigoroso do programa de vacinação.

Palavras-chave: Esgana canina, surto epidémico, sinais clínicos, Lisboa, Portugal.

## Abstract

### **Characterization of clinical signs of canine distemper during the outbreak of 2015-2018 in Lisbon Metropolitan Area, Portugal**

Canine distemper is caused by a morbilivirus (CDV), being one of the most severe infectious diseases of the domestic dog. The course of the disease is fast and the survival rate is low, especially if the dog is not hospitalized and put under veterinary care. A correct vaccination plan can prevent infection at individual level and control the disease in a population.

In this study, 49 cases of canine distemper were investigated at the Infectious Diseases Isolation Unit of the Veterinary Teaching Hospital of the Lisbon Veterinary Faculty. The following variables were analyzed: geographical location, sex, age, breed, clinical signs, days of hospitalization, vaccination status, survival rate, monthly disease frequency, laboratory diagnosis method and clinical analysis.

The main objective of the study was to characterize the clinical presentation of canine distemper cases, recorded during the outbreak occurred in 2015 in the Lisbon Metropolitan Area, which remained active until 2018. No statistically significant differences were found. The majority of the cases were diagnosed during the period from December to March. The most frequent clinical signs were myoclonus (42.9%), prostration (38.8%), oculonasal discharge (34.7%), gastrointestinal symptoms like diarrhea and vomiting (24.5%) and cough (22.4%). The average days of hospitalization was 4.57 days and the survival rate was 55.1%. Medical tests proved alterations of the hematocrit (44.8%), neutrophilia (31.0%), neutropenia (3.4%), lymphocytosis (6.9%), lymphopenia (20.7%), monocytosis (27.6%), monocytopenia (10.3%), eosinophilia (3.4%) and eosinopenia (55.2%). Only 17.9% of the infected dogs had a complete CDV vaccination plan, which reinforces the need to improve the communication with dog owners about the importance of strict compliance of vaccination schedules.

**Key words:** Canine distemper, outbreak, clinical signs, Lisbon, Portugal.



## Índice

Relatório de estágio .....	1
I. Introdução.....	2
II. Revisão bibliográfica.....	3
1-Vírus da esgana canina .....	3
1.1- Taxonomia .....	3
1.2- Estrutura viral.....	3
1.3- Replicação viral .....	6
1.4- Epidemiologia do vírus da esgana.....	6
1.5- Patogenia da infecção .....	8
1.5.1- Neuropatogénese .....	9
1.6- Sinais clínicos .....	12
1.7- Diagnóstico .....	14
1.7.1- Análises clínicas .....	14
1.7.2- Diagnóstico por imagem.....	15
1.7.3- Análise do líquido cefalorraquidiano.....	15
1.7.4- Imunofluorescência .....	16
1.7.5- Imunohistoquímica .....	17
1.7.6- Reação de polimerase em cadeia (PCR) .....	17
1.7.7- Métodos sorológicos.....	18
1.7.8- Isolamento do vírus .....	18
1.8- Tratamento .....	19
1.9- Quadros lesionais .....	19
1.10- Prevenção.....	21
1.11- Potencial impacto do CDV em Saúde Pública .....	24

III. Material e métodos.....	25
1.1- Fonte de dados, critérios de inclusão e testes estatísticos .....	25
IV. Resultados .....	26
1.1- Localização geográfica dos casos de esgana .....	26
1.2- Sexo .....	27
1.3- Idade.....	28
1.4- Raça .....	29
1.5- Sinais clínicos .....	30
1.6- Dias de internamento.....	31
1.7- Estatuto vacinal .....	31
1.8- Taxa de sobrevivência.....	32
1.9- Frequência mensal da doença.....	33
1.10- Métodos de diagnóstico.....	35
1.11- Rácio IgG/IgM.....	36
1.12- Análises clínicas .....	36
V. Discussão dos resultados .....	40
VI. Conclusão.....	43
VII. Bibliografia .....	44
VIII. Anexos .....	53

## Lista de figuras

Figura 1 – Inibição de célula apresentadora de antígeno .....	4
Figura 2 – Estrutura do vírus da esgana .....	5
Figura 3 – Mapa genético do <i>Canine Distemper Virus</i> .....	5
Figura 4 – Processo de infecção .....	9
Figura 5 – Infecção neural .....	11
Figura 6 – Principais locais de infecção .....	13
Figura 7 – Hiperqueratose do plano nasal e palminhas plantares, Dermatite pustular, Hipoplasia do esmalte.....	13
Figura 8 – Caso de esgana canina com padrão intersticial .....	15
Figura 9 – Corte transversal de crânio, a nível do cerebelo, de um cão com desmielinização, sequência T2, várias zonas de hiperintensidade.....	15
Figura 10 – Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) de animais positivos a esgana.....	17
Figura 11 – Neurónio com inclusões intracitoplasmáticas e intranucleares.....	21
Figura 12 – Epitélio respiratório com várias inclusões intracelulares.....	21
Figura 13 – Localização geográfica dos diversos casos recolhidos .....	26

## Lista de tabelas

Tabela 1 – Organização da família <i>Paramyxoviridae</i> .....	3
Tabela 2 – Análise comparativa dos casos confirmados de esgana por sexo .....	27
Tabela 3 – Média, moda, mediana, desvio padrão e coeficiente de variação da idade dos casos .....	28
Tabela 4 – Frequência de casos confirmados de esgana por escalão etário .....	29
Tabela 5 – Frequência de casos confirmados de esgana em cães de raça definida versus indefinida .....	30
Tabela 6 –Taxa de sobrevivência dos cães infetados .....	31
Tabela 7 – Frequência de doença por estatuto de proteção vacinal .....	32
Tabela 8 – Taxa de sobrevivência dos cães internados na UIDI confirmados ou suspeitos clínicos de esgana .....	32

## Lista de gráficos

Gráfico 1 – Distribuição dos casos de esgana por sexo e por diagnóstico de esgana.....	27
Gráfico 2 – Distribuição etária dos casos de esgana e por diagnóstico de esgana .....	28
Gráfico 3 – Distribuição dos casos de esgana por raça .....	29
Gráfico 4 – Frequência de sinais clínicos nos casos de esgana investigados .....	30
Gráfico 5 – Frequência mensal de cães internados na UIDI de 2015 a 2018 com esgana confirmada ou suspeitos clínicos de esgana .....	33
Gráfico 6 – Temperaturas mensais médias dos anos 2015-2018 .....	33
Gráfico 7 – Pluviosidade mensal média dos anos 2015-2018.....	34

Gráfico 8 – Frequência de testes laboratoriais .....	35
Gráfico 9 – Rácio de IgG e IgM dos casos de esgana testados .....	36
Gráfico 10 – Resultados do 1º hematócrito e do último hematócrito .....	37
Gráfico 11 – Frequência de neutrófilos não segmentados no primeiro e no último hemograma .....	37
Gráfico 12 – Frequência de neutrófilos segmentados no primeiro e último hemograma .....	38
Gráfico 13 – Frequência de linfócitos no primeiro e último hemograma .....	38
Gráfico 14 – Frequência de monócitos no primeiro e último hemograma .....	39
Gráfico 15 – Frequência de eosinófilos no primeiro e último hemograma .....	39

### Lista de abreviaturas, siglas, unidades e símbolos:

FMV	Faculdade de Medicina Veterinária
H	Hemograma
HEV	Hospital Escolar Veterinário
ULisboa	Universidade de Lisboa
UIDI	Unidade de Isolamento de Doenças Infeciosas
CDV	<i>Canine Distemper Virus</i> (Vírus da esgana canina)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
AI	Após inoculação
WSAVA	<i>World Small Animal Veterinary Association</i>

%	Porcentagem
µL	Microlitro

## **Relatório de estágio curricular**

O estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária (MIMV) que serviu de base a esta dissertação foi realizado nas áreas de Sanidade Animal e de Clínica dos Animais de Companhia, totalizando 1144 horas na Unidade de Isolamento de Doenças Infeciosas (UIDI) do Hospital Escolar Veterinário (HEV) da Faculdade de Medicina Veterinária (FMV) da Universidade de Lisboa (ULisboa). O estágio curricular decorreu de 16 de outubro de 2017 a 16 de fevereiro de 2018. Tive oportunidade de acompanhar e registar não só os casos de esgana canina analisados na presente dissertação, como de todas as doenças infecciosas dos cães e gatos internados nesse período na UIDI.

Durante o estágio curricular desenvolvi competências de trabalho em equipa e melhorei valências de âmbito pessoal. Participei nas rotinas diárias da UIDI, nomeadamente bem-estar, nutrição, monitorização dos sinais vitais dos pacientes e administração de medicação, e assisti a Professora Doutora Solange Gil na supervisão dos estudantes do 3º, 4º e 5º ano do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária (MIMV) nas suas aulas práticas das unidades curriculares de Atividades Hospitalares I, II, III, IV, V e VI, nomeadamente, na execução de tarefas como colheita de sangue, zaragatoas retais, oculares e nasais, colocação de cateteres e elaboração de pensos. Colaborei também na monitorização do cumprimento pelos estudantes das boas práticas de biossegurança na UIDI.

Participei ainda em várias consultas de reavaliação. Acompanhei pacientes ao Serviço de Imagiologia, quer para realização de raios-X quer de ecografias, tendo reforçado as minhas competências nestas áreas médicas.

## **I. Introdução**

Após décadas de silêncio epidemiológico, ou do registo de apenas casos esporádicos de esgana canina no HEV, em 2015 ocorreu na Área Metropolitana de Lisboa, um surto epidémico de esgana canina cujo epicentro se localizou no concelho de Loures, tendo depois alastrado aos concelhos de Odivelas, Lisboa, Amadora, Sintra e Almada.

Alguns dos casos deram entrada no HEV para consulta de primeira opinião, outros foram referenciados por médicos-veterinários dos concelhos mencionados, e todos foram internados na UIDI.

Surgiu assim a oportunidade de selecionar, compilar e analisar toda a informação disponível quer nas fichas clínicas destes cães quer nos sistemas de informação do HEV, primeiro o QVET, depois o GuruVet, com os objetivos de caracterizar a apresentação dos sinais clínicos, georreferenciar os casos, investigar potenciais fatores de risco, calcular a taxa média de sobrevivência à doença e aferir do programa vacinal dos cães.

A extensão temporal do surto epidémico até 2018, levou-nos a expandir o período de análise dos dados ao quadriénio 2015-2018.

O desejo de contribuir para a compreensão desta ocorrência e para sensibilizar a comunidade veterinária para o padrão de sinais clínicos observados, foi a principal motivação para realizar este estudo, sobretudo porque as gerações mais jovens de veterinários no terreno, ou nunca viram casos desta doença ou têm muito pouca experiência clínica de esgana canina, e é muito importante o diagnóstico e o alerta precoce para mitigar a dispersão geográfica da doença e evitar surtos epidémicos.

## II. Revisão Bibliográfica

### 1. Vírus da esgana Canina

#### 1.1. Taxonomia

O vírus da esgana (CDV, *Canine Distemper Virus*) é um morbilivírus que pertence à subfamília Paramyxovirinae da família Paramyxoviridae (Tabela 1). Tem uma cadeia de RNA simples e de sentido negativo, protegido por um envelope lipídico (Nishi, Tsukiyama-Kohara, Togashi, Kohriyama, Kai, 2004). Classifica-se o genótipo deste vírus com recurso à análise da proteína H, sendo conhecidos até ao momento oito genótipos diferentes: Ásia-1; Ásia-2; América-1; América-2; Europa-1/América do Sul-1; Europa-2; Europa-3 e África do Sul. Estão a ser investigadas estirpes da Argentina, África, Ásia e México que poderão revelar novos genótipos (Gámiz, Martella, Ulloa, Fajardo, Quijano-Hernández & Martínez, 2011; Panzera, Calderón, Sarute, Guasco, Cardeillac, Bonilla, Hernández, Francia, Bedó, La Torre & Pérez, 2012).

<i>Paramyxoviridae</i>	
<i>Paramyxovirinae</i>	<i>Pneumovirinae</i>
○ Respirovirus	○ Pneumovirus
○ Rubulavirus	○ Metapneumovirus
○ <b>Morbilivirus</b>	
○ Henipavirus	
○ Avulavirus	

Tabela 1. Organização da família *Paramyxoviridae*

#### 1.2. Estrutura viral

Os morbilivírus são vírus RNA capazes de infetar uma grande diversidade de hospedeiros, domésticos e silvestres. São vírus pleomórficos, com um diâmetro compreendido entre 150-350 nm, possuem um envelope lipídico com grandes espículas glicoproteicas (8-14 nm em comprimento) e contêm um nucleocapside helicoidal com cerca de 18 nm de diâmetro.

O genoma dos vírus da família *Paramyxoviridae* codifica 9 a 12 proteínas, através do *overlapping* sobre o locus da fosfoproteína P (Figura 3). A maioria destas proteínas estão associadas ao envelope viral ou ao RNA (MacLachlan & Dubovi, 2016).



A fosfoproteína (P) e a proteína polimerase (L) formam a RNA polimerase RNA dependente e estão associadas à proteína N que envolve o RNA (MacLachlan & Dubovi, 2016). A proteína N liga-se ao CD32 à superfície dos linfócitos B, o que dificulta a sua transformação em plasmócitos e liga-se também às células apresentadoras de antígenos (Figura 1), o que limita a função das células T (Kerdiles, Cherif, Marie, Tremilon, Blanquier, Libeau *et al.*, 2006).

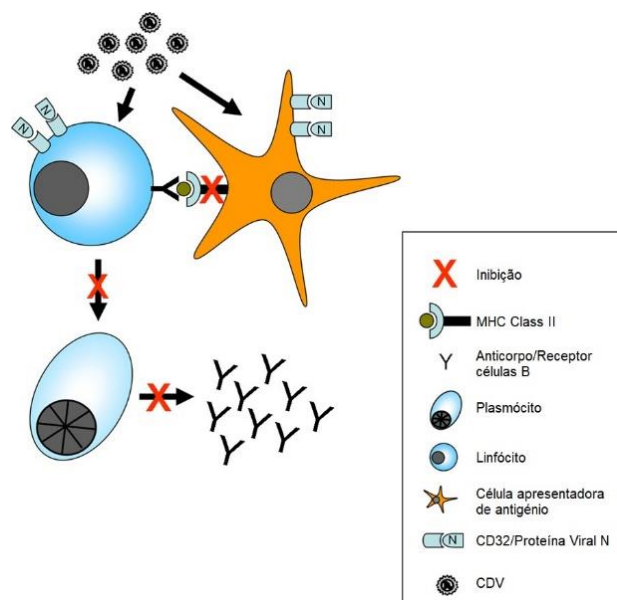


Figura 1. Inibição de célula apresentadora de antígeno (Lempp, Spitzbarth, Puff, Armend, Kegler, Techangamsuwan *et al.*, 2014)

Toda esta estrutura é rodeada pelo envelope viral que é formado por uma proteína matriz não glicosada (M) e por duas proteínas glicosadas (Figura 2), uma com função de fusão (F) e outra de ligação, que no caso dos morbilivírus é a hemaglutinina (H) (MacLachlan & Dubovi, 2016). Como o nome sugere, a proteína de ligação (H) tem como função ligar o vírus à célula hospedeira já que tem afinidade para a glicoproteína SLAM, presente à superfície de várias células. Após a ligação, ocorre alteração estrutural da proteína H, que culmina na transmissão de um sinal à proteína F para que ocorra a fusão (von Messling, Zimmer, Herrler, Haas & Cattaneo, 2001; Carvalho, Botelho, Ferreira, Scherer, Soares-Martins, Almeida & Júnior, 2012).

A proteína F é iniciada pelo precursor inativo (F0) que sofre ação das proteases da célula hospedeiro, com quebra de proteínas e consequente ativação. Os péptidos quebrados mantêm-se ligados por pontes de dissulfureto. A natureza do processo e as características da F0 dependem do tipo de vírus, porém no caso dos paramyxovirus distinguem-se dois grupos, os que possuem apenas um local de clivagem e os que possuem múltiplos locais de clivagem. A clivagem de F0 é essencial para a infecção,

sendo que os vírus com múltiplos locais de clivagem são mais virulentos. Após ativação, a proteína F1 torna-se hidrofóbica e é inserida na membrana da célula hospedeira para completar o processo de fusão. Os anticorpos específicos para a glicoproteína de ligação inibem a adsorção do vírus, mas anticorpos dirigidos contra a proteína F também o neutralizam. A proteína M tem ligações com o envelope lipídico, com a extremidade citoplasmática da proteína F, com a proteína H, bem como a ribonucleoproteína (RNP) e controla os níveis de síntese de RNA, sendo considerada uma peça central do vírus (MacLachlan & Dubovi, 2016).

Estão também presentes várias proteínas não estruturais (C, NS1, NS2), uma proteína rica em cisteína que se liga ao zinco (V), uma pequena proteína membrana (SH) e os fatores de transcrição M2-1 e M2-2 (MacLachlan & Dubovi, 2016).

A proteína V permite ao vírus uma rápida replicação nas células T e é fulcral para a imunossupressão causada pelo CDV, quase que conseguindo antagonizar totalmente IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$  e IL-2 na fase inicial da infecção (von Messling, Svitek & Cattaneo, 2006).

É ainda importante referir que as proteínas têm variabilidade entre estirpes, sendo de 4% em F1, 33% em F0 e 10% em H (von Messling *et al.*, 2001).

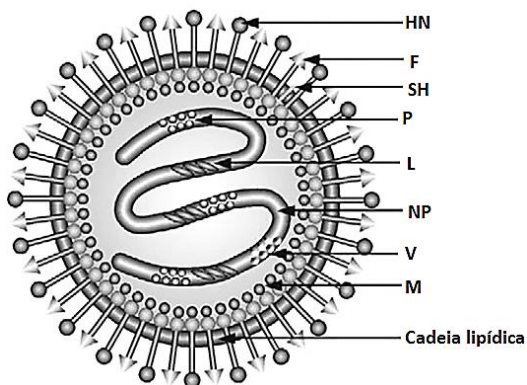


Figura 2. Estrutura do vírus da esgana (retirado de MacLachlan & Dubovi, 2016)

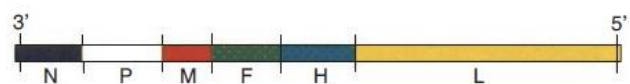


Figura 3. Mapa genético do CDV (retirado de Greene & Vandeveld, 2012)

### **1.3. Replicação viral**

Os vírus da família Paramyxoviridae causam um ciclo lítico em cultura de células, ou seja, invadem a célula hospedeira com domínio sobre o seu metabolismo. A formação do sincício é característica da infecção em culturas de células. Apesar da replicação viral ser estritamente citoplasmática, pode haver produção intranuclear de complexos de elementos nucleares bem como da proteína N. A replicação continua na presença de actinomicina D e em células não nucleadas, comprovando que não são necessárias funções nucleares para esta decorrer (MacLachlan & Dubovi, 2016).

O tropismo do vírus da esgana para as células imunitárias do hospedeiro deve-se à presença da glicoproteína SLAM, acrónimo para *Signaling Lymphocytes Activation Molecule*, à superfície de células T imaturas, linfócitos ativados, macrófagos e células dendríticas (Sykes, 2014).

As células epiteliais expressam na sua superfície a proteína nectina-4 que é responsável pela fusão do vírus com este tipo de células (Noyce, Delpeut & Richardson, 2013).

Importa salientar que durante a infecção por CDV, o SLAM aumenta nas células linfoides, o que é uma estratégia de replicação do CDV no hospedeiro (Beineke, Puff, Seehusen & Baumgartner, 2009).

Através das proteínas H e F, o vírus liga-se às células imunitárias levando à sua rápida disseminação nos tecidos linfoides. A imunossupressão consequente é o resultado da citólise induzida pelo vírus e pelas proteínas V e C (expressas pelo gene P) que inibem o interferão e as citocinas (von Messling *et al.*, 2006).

### **1.4. Epidemiologia do vírus da esgana**

O CDV pode ser transmitido por várias vias tais como aerossóis, contacto com gotículas e via transplacentária. Pode ainda ser isolado a partir da urina e das fezes (Deem, Spelman, Yates & Montali, 2000). O período de incubação da doença varia de 1 a 4 semanas. A doença pode ocorrer em qualquer idade, mas é mais frequente em cães não vacinados, com idades compreendidas entre as 12 e as 16 semanas que perderam os anticorpos maternos ou em cachorros com baixos títulos de anticorpos maternos protetores (<80 UI/ml).

A infeção inicia-se nos macrófagos do trato respiratório superior e tem duas fases de virémia. A primeira caracteriza-se por uma enorme replicação viral e disseminação sistémica do CDV nos tecidos linfóides, resultando em febre e imunossupressão. A segunda fase ocorre 6 a 9 dias após a infeção e conduz à infeção generalizada das células epiteliais e do parênquima. O período de excreção do vírus é cerca de 60 a 90 dias, pelo que é o contacto com cães doentes ou com os produtos virulentos que perpetua o vírus nas populações e nos ecossistemas. Embora o contato com o vírus induza uma imunidade duradoura, não se pode afirmar o mesmo sobre a vacinação (Coyne, Burr, Yule, Harding, Tresnan & McGavin, 2001). De fato, a vacinação precisa de ser periódica, de forma a manter o cão imune, caso contrário há perda gradual de imunidade e o animal pode ser infetado após stress, imunossupressão ou doenças concomitantes. Muitos cães infetados podem excretar o vírus sem exibir sinais clínicos. A maioria dos cães que recupera da doença, elimina o vírus na sua totalidade. Numa pequena proporção os cães infetados mantêm o vírus acantonado no Sistema Nervoso Central (SNC).

A prevalência de esgana em cães residentes em regiões metropolitanas é mais elevada entre os 3 e os 6 meses de idade, devido à perda dos anticorpos maternos. Em populações isoladas, a doença pode afetar cães de qualquer idade (Martella, Elia & Buonavoglia, 2008).

A interface cão doméstico-animais silvestres-ambiente está na génese de surtos epidémicos de esgana canina causados por estirpes que circulam nos hospedeiros silvestres (Greene & Vandeveld, 2012). Por exemplo, nos Estados Unidos da América está documentada a transmissão do CDV interespécies, devido à partilha do ambiente urbano entre cães domésticos e guaxinins (Beineke, Baumgartner & Wohlsein, 2015).

Cães errantes infetados, mas assintomáticos, e surtos epidémicos em canis/abrigos também estão associados à eclosão de epidemias de esgana canina em zonas metropolitanas (Kuehn, 2004; Kapil, Allison, Johnston, Murray, Holland, Meinkoth & Johnson, 2008).

Em Portugal, no ano de 2016, em Loures, Odivelas e na Charneca da Caparica registaram-se focos de esgana, afetando cães alojados em abrigos municipais e privados, cães errantes e cães vacinados, o que reflete a patogenicidade do CDV, a

incapacidade das vacinas para prevenirem a infecção com estirpes menos frequentes ou novas e calendários de vacinação incompletos.

Os animais infectados podem excretar o vírus nas suas secreções e excreções durante 1 a 2 semanas e caso recuperem da infecção, acompanhada ou não de sinais neurológicos, podem manter o vírus acantonado nos seus tecidos. O CDV é bastante suscetível a desinfetantes, luz ultravioleta e à exposição a ambientes quentes e secos (Greene & Vandeveld, 2012).

### **1.5. Patogenia da infecção**

O CDV transmite-se, sobretudo, pela inalação de aerossóis (Anexo 1), mas também por contacto com urina e fezes contaminadas e, no caso de animais silvestres pela ingestão de carne e de órgãos de animais infectados. Cerca de 24 horas após a exposição, ocorre multiplicação do CDV nos macrófagos e nos linfócitos T e B em circulação. Depois o CDV invade as vias linfáticas e posteriormente as amígdalas e os linfonodos bronquiais e retrofaríngeos (Figura 4). Ao 4<sup>o</sup>-6<sup>o</sup> dia pós-infecção ocorre multiplicação do vírus nos linfonodos mesentéricos, folículos linfóides do baço, no GALT, células de Kupffer e na medula óssea (Summers, Appel & Greisen, 1979). Nesta primeira semana a infecção é acompanhada por linfopénia resultante da elevada multiplicação viral e da depleção de linfócitos.

A linfopénia é caracterizada pela diminuição transitória de células T *helper* CD4+, células T citotóxicas CD8+ e células B CD21+ do sangue periférico. As células T *helper* CD4+ são as mais afetadas enquanto que a depleção de CD8+ é menor e de curto tempo de recuperação (Carvalho *et al.*, 2012). É possível que esta depleção celular resulte dos efeitos do CDV sobre as células dos órgãos linfáticos primários e secundários, assim como da apoptose dos leucócitos na circulação periférica. Porém a apoptose de glóbulos brancos também é detetada em células não infectadas, o que sugere a existência de outro mecanismo, independente do vírus. A inativação do sistema imunitário inato ou a apoptose induzida por FAS, são possíveis causas de morte de células linfáticas infectadas pelo CDV (Beineke *et al.*, 2009).

No dia 8 e 9 da infecção o vírus pode atingir outros tecidos epiteliais e o SNC por via sanguínea, graças à circulação sanguínea do vírus e de células infectadas, já que estas infiltram os epitélios com libertação de grandes quantidades de vírus. Nesta fase o estado imunológico do cão é fulcral, pois se os animais possuírem títulos adequados de anticorpos assim como de células citotóxicas, conseguirão eliminar o vírus dos

vários tecidos sem apresentarem sinais clínicos da doença. Os anticorpos IgG-CDV são eficazes a neutralizar os CDV extracelulares e a inibir os CDV intracelulares. Em cães com baixos títulos de anticorpos, a replicação viral ocorre em tecidos como a pele, as glândulas endócrinas e exócrinas, o epitélio gastrointestinal, respiratório e o trato geniturinário, e os sinais clínicos são mais evidentes. Porém, o CDV pode manter-se latente em diversos tecidos como na úvea, nos neurónios e nas almofadinhas plantares. A imunossupressão resultante da infecção pode conduzir a infecções bacterianas secundárias que agravam o prognóstico (Aguiar, Amude, Santos, Ribeiro, Ueno, Megia *et al.*, 2012; Park, Choi, Kim, Lee, Lee, Cho, *et al.*, 2016).

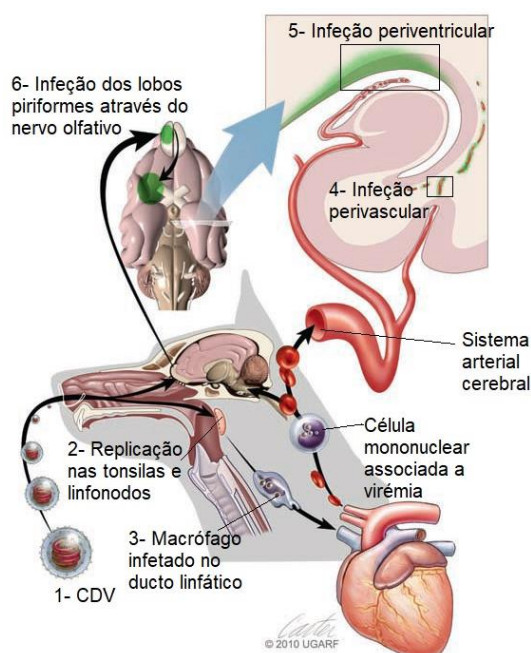


Figura 4. Processo de infecção (retirado de Greene & Vandevelde, 2012)

Foi realizado um ensaio experimental com dois grupos de cães, em que no primeiro grupo foi medida a resposta imunitária a componentes do envelope do vírus, enquanto que no segundo grupo aferiu-se a resposta imunitária a outras componentes do CDV. Concluiu-se que apenas os cães com anticorpos contra os componentes do envelope estavam protegidos contra a infecção do SNC, dependendo, portanto, da quantidade de IgG contra a glicoproteína H (Rima, Duffy & Mitchell, 1991).

### 1.5.1. Neuropatogénese

Para que ocorra infecção do SNC a virémia tem de ser suficiente, o que depende da resposta imunitária do hospedeiro. Afim de estudar a neuropatogénese do vírus, Rudd, Bastien-Hamel & von Messling (2010) recorreram a furões e a CDV marcado com uma proteína fluorescente e concluíram que a infecção do SNC se dá quer por via

sanguínea quer por via neural. Por via sanguínea o CDV alcança o parênquima através dos capilares sanguíneos e deposita-se nos espaços perivasculares. Por via neural a invasão progride devido à replicação do vírus no epitélio da mucosa respiratória na zona do etmóide, atravessa a membrana cribiforme, atinge os nervos recetores olfativos, as fibras do nervo olfativo, o córtex olfativo e por fim, o sistema límbico. Esta dinâmica de infeção ajuda a explicar os casos de cães com poliencefalomalácia seletiva de estruturas rinencefálicas, bem como nos lobos piriforme e temporal.

Através da via sistémica, o vírus penetra no plexo coróide do quarto ventrículo e replica-se nas células epiteliais. Nos cães pode haver invasão do líquido cefalorraquidiano por vírus ou por linfócitos infetados, progredindo o CDV para estruturas periventriculares e subpial, como o nervo ótico, os pedúnculos cerebrais e a medula espinal. O CDV tem grande afinidade para tecidos e células mielinizadas. Os astrócitos correspondem a 95% das células infetadas (Mutinelli, Vandeveld, Griot & Richard, 1989). A imunossupressão resultante da infeção, assim como a ausência de inflamação devido à depleção de células no espaço endotelial, conduz à desmielinização. Ainda se desconhece o mecanismo envolvido na desmielinização, mas persistem duas hipóteses: dano direto ou degeneração. A primeira hipótese defende dano direto na mielina, acompanhado de microvacuolização e de perda de organelas por parte dos oligodendrócitos com efeitos nefastos à produção de cerebrosídeo sulfotransferase, essencial na produção de mielina. A segunda hipótese, já demonstrada, consiste numa degeneração resultante da infeção do vírus, pela estimulação de células de microglia que leva à produção de MHC II que se encontra difuso no SNC, CD44 (uma proteína de adesão), radicais livres de oxigénio, enzimas proteolíticas e aumento de fagócitos. Todos estes fatores concorrem para a lesão dos oligodendrócitos e, por conseguinte, à redução da produção de mielina (Carvalho *et al.*, 2012).

No início da infeção por CDV, em cães jovens ou imunossuprimidos, pode surgir encefalite aguda. Tanto o antígeno de CDV como o mRNA é detetado nas lesões de encefalite que estão presentes quer na matéria branca quer na matéria cinzenta. As lesões da matéria cinzenta resultam da infeção neural (Figura 5), com necrose, podendo surgir encefalomalacia.

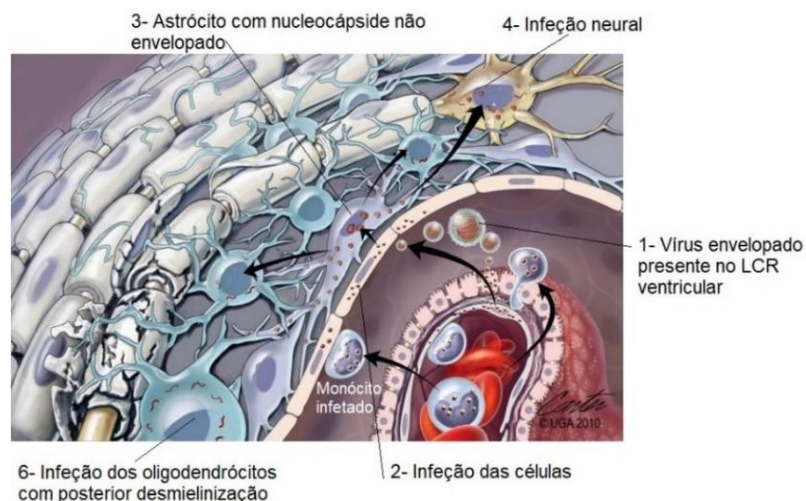


Figura 5. Infecção neural (retirado de Greene & Vandeveld, 2012)

As lesões da matéria branca estão associadas à replicação do vírus em células da glia e a lesões mielínicas (Carvalho *et al.*, 2012). As lesões são caracterizadas quanto ao tempo e ao perfil histológico. Experimentalmente, as lesões agudas correspondem ao período de 16 a 24 dias pós-infecção, estando presentes linfócitos T e observando-se vacuolização da matéria branca devido ao edema das bainhas de mielina. As lesões subagudas, observam-se no período de 24 a 32 dias, e caracterizam-se por perda progressiva de mielina, células eosinófilas e pigmentação. Por fim, do 24º ao 32º dia, surgem as lesões crônicas com grandes quantidades de células inflamatórias, desmielinização e degenerescência axonal (Lempp, *et al.*, 2014).

Os locais mais atingidos pelas lesões são o cerebelo, o quarto ventrículo, o nervo ótico e a medula espinal (Carvalho *et al.*, 2012).

No início da infecção os cães têm linfopenia devido à apoptose induzida pelo vírus, principalmente sobre os linfócitos T CD4+, o que explica a diminuição destas células nos endotélios (Wünschmann, Alldinger, Kremmer & Baumgärtner, 1999; Tipold, Vandeveld, Wittek, Moore, Summerfield & Zurbriggen, 2001).

Há um aumento dos linfócitos T CD8+ no SNC de cães com esgana, nas zonas desmielinizadas e em locais difusos do parênquima cerebral, refletindo a resposta à presença de proteínas do vírus e ao aumento da atividade de IL-8. Este aumento sugere que as células da microglia podem desencadear uma resposta com células T (Carvalho *et al.*, 2012).

Com o auxílio de microscopia ótica e eletrônica, pode-se relacionar a desmielinização aguda e não inflamatória com a replicação viral nas células da microglia e nos astrócitos, em vez de nas células produtoras de mielina, os oligodendrócitos. Porém, através da análise dos oligodendrócitos em culturas de células de cérebro,



comprovou-se que a sua função se encontra diminuída, não ocorrendo replicação viral nestas estruturas. Com recurso à hibridação *in situ* confirmou-se a presença do genoma viral (Zurbriggen, Muller & Vandeveld, 1993).

Resumindo, a infeção do SNC e o tipo de lesão induzida dependem de fatores como a idade, a imunocompetência do hospedeiro, as características do vírus e a cronicidade das lesões (Greene & Vandeveld, 2012).

### **1.6. Sinais clínicos**

Nos cães infetados pelo CDV, os sinais clínicos apresentados dependem de vários fatores: estirpe do vírus; condições ambientais; idade do hospedeiro; estado vacinal; infeções secundárias por outros vírus ou bactérias (Figura 6).

Calcula-se que mais de 50% das infeções sejam subclínicas. A forma mais comum de apresentação clínica da doença é a moderada, com sinais clínicos como apatia, anorexia, febre e infeção respiratória do trato respiratório superior com corrimentos bilaterais oculonasais serosos que podem passar a mucopurulentos, acompanhados por tosse e dispneia (Gámiz *et al.*, 2011). Os sinais oculares, consistem em uveíte, coriorretinite, queratite, neurite ótica e queratoconjuntivite seca, provavelmente por lesão da glândula lagrimal (De Almeida, Roveratti, Brito, Guilherme, Duque, Bechara & Laus, 2009). Estes sinais oculares estão associados a encefalomielite, sendo o resultado da atividade do vírus no nervo ótico e/ou na retina. É possível o aparecimento de áreas irregulares na zona tapetal e/ou não tapetal, de cor cinzenta a rosa, resultantes da degeneração e da necrose da retina. Pode observar-se descolamento da retina devido à infiltração de exsudado na mesma (Richards, Whelan, Pinard, Alcala & Wolfe, 2011).

A forma severa da esgana canina caracteriza-se por estados febris iniciais que não são detetados, conjuntivite serosa a mucopurulenta, e tosse seca que evolui para tosse produtiva (Greene & Vandeveld, 2012). Devido à destruição do epitélio intestinal ocorre também inapetência, apatia, vômito, diarreia que pode variar de fluída a sanguinolenta e mucoide, assim como desidratação e desequilíbrios hidroeletrólíticos (Sykes, 2014). O aumento da motilidade intestinal pode causar invaginações e tenesmo. A taxa de mortalidade nesta forma da doença é elevada, porém com a hospitalização dos pacientes e terapia apropriada é possível reduzi-la (Machado, 2016).

Os sintomas dermatológicos como a dermatite vesicular e pustulosa não estão associados à infecção do SNC, ao contrário da hiperqueratose do focinho e das almofadinhas plantares (Figura 7). Neste último caso, há invasão do epitélio palmar pelo CDV, com multiplicação do vírus nos queratócitos basais, acompanhada de lesões microscópicas de formação de vesículas e de corpos de inclusão.

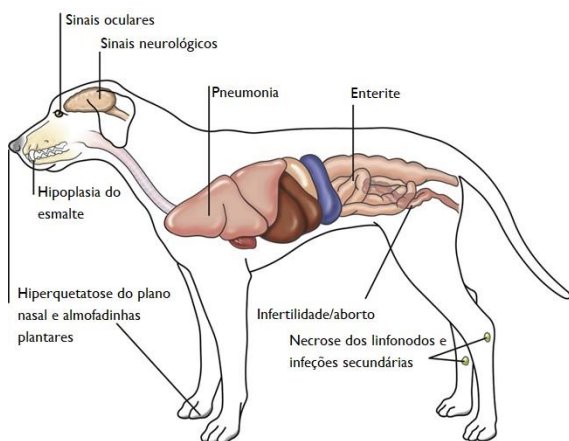


Figura 6. Principais locais de infecção (Sykes, 2014)



Figura 7. 1 e 2- Hiperqueratose do plano nasal e palminhas plantares; 3- Dermatite pustular; 4- Hipoplasia do esmalte (retirado de Greene & Vandevelde, 2012)

Os sinais neurológicos podem surgir 1 a 3 semanas após a recuperação do episódio clínico e não é possível prever quais os animais que irão desenvolver quadros neurológicos. Cães vacinados e sem doença sistêmica podem desenvolver sinais neurológicos da doença, sendo estes progressivos, independente de serem agudos ou crônicos. Cerca de 30% dos cães infectados desenvolvem sinais neurológicos, sendo característicos de determinadas estirpes, tais como, a Snyder Hill (Pearce-Kelling, Mitchell, Summers & Appel, 1991). As complicações neurológicas afetam o prognóstico e a taxa de recuperação e variam consoante a zona do SNC atingida.

Devido à inflamação meníngea, alguns cães apresentam rigidez cervical ou paravertebral, e hiperestesia. É comum ocorrerem convulsões, sinais cerebelares e vestibulares, paraparésia ou tetraparésia com ataxia sensorial e mioclonias. As convulsões variam consoante a região do cérebro atingida. Assim sendo, o reflexo de mastigação surge em cães que desenvolvem poliencefalomalácia nos lobos temporais. É possível observar-se convulsões tónico-clónicas que podem evoluir para epilepsia. No caso de ocorrerem danos mais extensos na medula espinal, pode haver paresia do neurónio motor superior que afeta o membro em questão, juntamente com o aparecimento de mioclonias, quer durante o sono quer com o animal acordado. As

mioclonias resultam da inflamação dos neurónios motores inferiores da medula espinal ou do núcleo do nervo craniano.

No caso de infeção de cadelas gestantes os cachorros podem infetar-se no útero ou após o nascimento. A infeção no útero pode resultar em morte fetal, aborto ou no nascimento de cachorros imunossuprimidos devido a lesões dos órgãos linfáticos. Os cachorros podem exibir sinais neurológicos durante a 4<sup>o</sup> a 6<sup>o</sup> semana de vida, associados a dificuldades respiratórias fatais.

Os cachorros que são infetados com o CDV antes da erupção dentária definitiva manifestam lesões da raiz dentária, da dentina e do esmalte, sendo que nos últimos dois casos pode haver apenas alteração estética dos dentes (Figura 7). Pode também observar-se erupção dentária incompleta, oligodontia e dentes inclusos.

A nível ósseo, cães jovens e em crescimento infetados pelo CDV apresentam osteosclerose dos ossos longos, principalmente nos cães de raça de grande porte com 3 a 6 meses de idade (Mee, Webber, May, Bennett, Sharpe & Anderson, 1992; Mee, Gordon, May, Bennett, Anderson & Sharpe, 1993).

Infeções bacterianas secundárias, normalmente por *Bordetella bronchiseptica*, podem concorrer e agravar a broncopneumonia. Estão também relatados casos de toxoplasmose, salmonelose, nocardiose e demodexicose em cães infetados pelo CDV (Sykes, 2014).

## **1.7. Diagnóstico**

### **1.7.1. Análises clínicas**

A realização de análises clínicas ajuda a reforçar a suspeita clínica e a formular um diagnóstico, já que na maioria dos casos estão alteradas (Anexo 3). Normalmente, cães jovens com doença progressiva ou com sinais neurológicos, têm linfopenia absoluta, resultante da depleção destas células. Em neonatos, infetados experimentalmente, comprovou-se a existência de trombocitopénia e de anemia regenerativa, o que não se observou em idades mais avançadas. Os neonatos podem ainda apresentar diminuição das globulinas  $\alpha$  e  $\gamma$ . A alteração das bioquímicas séricas é inespecífica, embora a albumina se encontre diminuída (Greene & Vandevelde, 2012). Pode-se verificar neutrofilia com desvio à esquerda ou neutropenia, monocitopénia e trombocitopenia (Sykes, 2014). Numa fase inicial da doença, através da observação microscópica de amostras do sangue periférico, é possível detetar as

inclusões intracitoplasmáticas do vírus, denominadas corpos de Lentz, em células como linfócitos (mais frequente), monócitos, neutrófilos e eritrócitos. Através da coloração de Wright-Leishman podemos observar nos linfócitos, inclusões de grandes dimensões, ovais e de tonalidade cinza, ao passo que nos eritrócitos as inclusões são redondas e de cor azul.

### 1.7.2. Diagnóstico por imagem

A radiologia revela inicialmente um padrão intersticial pulmonar que evolui para alveolar (Figura 8), devido a infecção bacteriana secundária e a broncopneumonia, sobretudo no lobos craniais e ventrais dos pulmões (Sykes, 2014). Na ressonância magnética (Figura 9) observa-se em imagens T2 do cérebro, um foco hipertenso acompanhado de perda de contraste entre a massa cinzenta e a massa branca na área do cerebelo, cuja histopatologia é conclusiva de desmielinização (Bathen-Noethen, Stein, Puff & Baumgaertner, 2008; Griffin, Young & Levine, 2009).

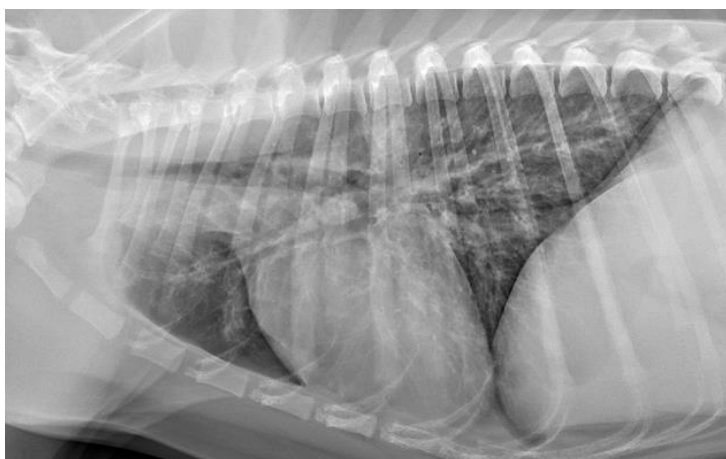


Figura 8. Caso de esgana canina com padrão intersticial (retirado de <https://www.cliniciansbrief.com/article/common-pulmonary-diseases-dogs>)

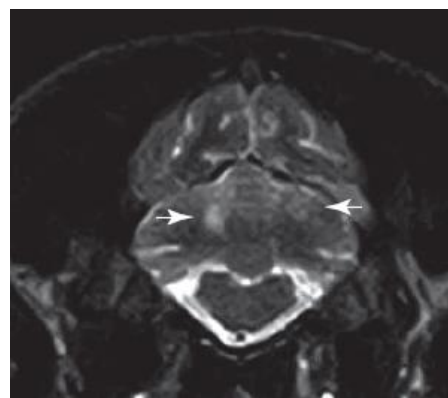


Figura 9. Corte transversal do crânio a nível do cerebelo de um cão com desmielinização, sequência T2, várias zonas de hiperintensidade representadas pelas setas (retirada de Greene e Vandeveld, 2012).

### 1.7.3. Análise do líquido cefalorraquidiano

O líquido cefalorraquidiano (LCR) apresenta alterações nos cães infetados pelo CDV com sinais neurológicos, sendo um importante exame complementar no diagnóstico de esgana. Devido à inflamação e à produção de imunoglobulinas, há alteração da barreira hematoencefálica com aumento da sua permeabilidade, levando desta forma ao aumento de proteínas no LCR. É possível observar inclusões intracitoplasmáticas em células do LCR.

A encefalomielite associada à infecção por CDV, subaguda e crônica, é caracterizada por um aumento da proteína (mais de 25 mg/dl) e do número de células (mais de 10 células por  $\mu$ L, sendo a maioria linfócitos).

É de frisar, que o aumento de anticorpos contra o CDV no LCR é indicativo de encefalite secundária, já que a produção de anticorpos é local pois não se verifica em cães vacinados ou com doença sistêmica desprovida de sinais neurológicos (Amude, Alfieri & Alfieri, 2007; Gama, Santana, Filho & Nogueira, 2007).

#### **1.7.4. Imunofluorescência**

Utiliza-se a técnica de imunofluorescência em esfregaços do epitélio conjuntival, tonsilar, genital e respiratório, células do LCR, sangue, sedimento urinário e medula óssea. As lâminas com os esfregaços devem ser limpas, secas ao ar e fixas com acetona, cinco minutos antes de serem enviadas para o laboratório, onde vão ser expostas a anticorpos anti-CDV marcados com fluoresceína e observadas ao microscópio de fluorescência. O antígeno é detectado na *buffy coat* do 2º ao 5º dia pós-inoculação, diminuindo há medida que o título de anticorpos aumenta no dia 8 a 9 pós-inoculação. Após este período, os sinais clínicos tornam-se evidentes e os resultados positivos são de cães com respostas imunitárias deficientes e que cederam à infecção. Em esfregaços do epitélio conjuntivo e genital, a fluorescência é positiva até às 3 semanas pós-inoculação. Porém com o aumento progressivo dos níveis de anticorpos após as primeiras duas semanas de doença, a concentração de vírus nestes tecidos diminui.

O vírus persiste nas células epiteliais e nos macrófagos do trato respiratório inferior, pelo que se pode ponderar a lavagem broncotraqueal. Pode também permanecer até 60 dias na úvea, na pele, nas almofadinhas plantares e no SNC (Brown, Morrow, Heron & Chong, 1987; Deem *et al.*, 2000).

### 1.7.5. Imunohistoquímica

A imunohistoquímica, é uma técnica de diagnóstico realizada sobre biopsias, amostras congeladas ou provenientes de necropsias, que identifica células específicas recorrendo à peroxidase. As amostras *antemortem* a recolher são da mucosa nasal, epitélio das almofadinhas plantares e pele da face dorsal do pescoço. No caso de necropsia deve colher-se baço, amígdalas, linfonodos, estômago, pulmão, duodeno, bexiga e cérebro (Haines, Martin, Chelack, Sargent, Outerbridge & Clark, 1999; An, Kim, Song, Kang & Park, 2008).

### 1.7.6. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A PCR (Figura 10) recorre a células da *buffy coat*, sangue, soro e LCR, em cães com esgana sistémica ou neurológica, para proceder à deteção de RNA viral. Um resultado positivo confirma o diagnóstico, independentemente dos sinais clínicos observados. Mesmo em cães com doença subclínica a sensibilidade (Se) e a especificidade (Sp) da PCR são muito elevadas: Se=100% (81.9-100%); Sp= 92% (85.3-97.0%) (Moritz, Baumgärtner, Frisk, König & Matthias, 2003), e os resultados são positivos em amostras sanguíneas, fecais, esfregaços nasais e conjuntivais.

Em comparação com a imunohistoquímica, a PCR é mais eficiente na deteção de CDV no sistema nervoso de animais com infeção subaguda ou crónica. A grande desvantagem deste método de diagnóstico é a incapacidade que a maioria das PCR têm de distinguir entre o antígeno viral e vacinal, sendo necessário conhecer a história vacinal dos cães para interpretar corretamente os dados (Cho & Park, 2005; Amude *et al.*, 2007).

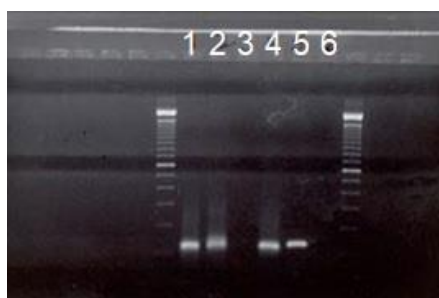


Figura 10. PCR de animais positivos a esgana (1,2,4) sendo 3 negativo, 5 controlo positivo e 6 controlo negativo (retirado de <http://csu-cvmbbs.colostate.edu/vdl/Pages/four-cases-canine-distemper-pneumonia-in-neonatal-pups.aspx>)

### **1.7.7.Métodos sorológicos**

Há uma relação diretamente proporcional entre os níveis de anticorpos e a proteção contra a infecção. No caso da infecção pelo CDV, os anticorpos são dirigidos contra as proteínas H e F, sendo que a produção de anticorpos se inicia entre os 10 a 20 dias pós-infecção, podendo conferir proteção vitalícia.

Dos métodos sorológicos disponíveis destacamos a seroneutralização, a neutralização por redução de placas, a imunofluorescência indireta (utilizada para determinação dos níveis de anticorpos pós-vacinais) e, embora com uma menor especificidade, o teste de ELISA que deteta IgM e IgG. O ELISA é bastante utilizado, conseguindo detetar IgM e IgG a partir do 6º a 8º dia pós-infecção. O título de IgM aumenta nos cães que sobrevivem à doença e desaparece após 3 meses. Indica, portanto, uma infecção recente. Já o título de IgG indicia quer infecções recentes ou antigas. Os cães que não desenvolvem IgM e IgG, ou cuja produção de imunoglobulinas seja insuficiente, tendem a falecer ou a ser eutanasiados devido à gravidade dos quadros clínicos (Kubo, Kagawa, Taniyama & Hasegawa, 2008).

### **1.7.8.Isolamento do vírus**

Uma das principais desvantagens deste método é a dificuldade de isolar o CDV em cultura de células. Os anticorpos vacinais podem estar presentes em vários tecidos e células como, macrófagos, linfócitos, células renais e células epiteliais, enquanto que os vírus infetam sobretudo os macrófagos e os linfócitos. Assim sendo, as culturas celulares são de macrófagos, de linfócitos e ainda de células Vero (também utilizadas na seroneutralização). Os resultados mais bem-sucedidos são os que usam células do cão infetado. As mais utilizadas são células recolhidas da *buffy coat* nas fases iniciais da doença, sendo “cultivadas” juntamente com linfócitos caninos e mitógeno que acelera a mitose destas células. Após 72 a 144 horas, a amostra deve ser observada com recurso a imunofluorescência. Nas culturas de macrófagos alveolares, a deteção do CDV é possível em 1 a 2 dias. Nas culturas de células infetadas formam-se sincícios, característica citopática do CDV. Este método é ineficaz em culturas de células recolhidas de cães com encefalite crónica devida à fraca replicação viral (Appel, Pearce-Kelling & Summers, 1992).

## **1.8. Tratamento**

O tratamento da esgana tem uma função de suporte, baseando-se na fluidoterapia, alimentação apropriada, antieméticos e, nos casos mais graves, nebulização e oxigenoterapia.

Tal como ocorre na UIDI, um cão suspeito de esgana deve ser imediatamente isolado, de forma a reduzir a probabilidade de transmissão da infeção a outros cães, e desta forma, mitigar a ocorrência de surtos epidémicos.

No caso de manifestação de sinais respiratórios ligeiros, é administrada doxiciclina, porém caso se diagnostiquem broncopneumonias graves está recomendado o uso de ampicilina e a suplementação com vitamina C e A. Para o controlo das convulsões estão indicados o diazepam, o fenobarbital e o brometo de potássio (Wiebe, 2015).

Como já referimos, graças à vacinação regular dos cachorros desde os anos 80 do século XX, assistiu-se a uma redução progressiva da incidência da esgana canina em Portugal. Porém, o maior receio da comunidade veterinária são possíveis variações da proteína H do vírus, que têm desencadeado investigações que conduziram ao desenvolvimento de novos princípios ativos como a ribavirina e o ribossídeo de 6-metilmercaptapurina, que inibem *in vitro* a capacidade de replicação do CDV. A ribavirina (1-β-D-ribofuranosil-1,2,4-triazol-3-carboxamida) é um nucleósido análogo da purina, enquanto que o ribossídeo de 6-metilmercaptapurina (6MMPr) resulta da conversão da azatioprina em 6-metilmercaptapurina, por processos enzimáticos, formando o ribossídeo 6-metilmercaptapurina. O 6MMPr é menos tóxico e mais eficaz que a ribavirina (Carvalho, Félix, Tozado, Fietto, de Almeida, Bressan, Pena & Silva-Júnior, 2017).

Na UIDI, o tratamento-base dos cães com esgana consiste na administração de fluidoterapia apropriada, ampicilina e, nas formas nervosas, tramadol ou propofol nos quadros convulsivos prolongados.

## **1.9. Quadros lesionais**

Os neonatos infetados tendem a apresentar atrofia do timo (Alves, Vasconcelos, Martins, del Puerto, Santos, Nunes, Campos & Moro, 2006).

A encefalite é normalmente acompanhada de degeneração e de desmielinização, porém sem inflamação perivascular, observando-se lesões como vacuolização da



massa branca e inflamação das células da glia. Na massa branca as lesões estão presentes nos pedúnculos cerebelares laterais, na zona dorsolateral da medula adjacente ao quarto ventrículo, núcleos cerebelares, nervo ótico, medula espinal, mesencéfalo, núcleos da base, córtex cerebral e os seus lobos piriformes. As lesões associadas à massa cinzenta não são de natureza inflamatória, afetam o cérebro e o tálamo, e podem estar presentes inclusões intracitoplasmáticas ou intranucleares nos astrócitos e neurónios como se pode verificar nas Figuras 11 e 12 (Silva, Fighera, Brum, Graça, Kommers, Irigoyen & Barros, 2007; Sonne, Oliveira, Pescador, Santos, Pavarini, Carissimi & Driemeier, 2009; Greene & Vandeveld, 2012).

Os cachorros infetados podem apresentar pneumonia, enterite catarral, bem como deficiente deposição do esmalte. A invasão do tecido epitelial respiratório pelo CDV pode causar conjuntivite, rinite e traqueobronquite. Nos quadros neurológicos observa-se congestão, dilatação dos ventrículos e edema, devido ao aumento da pressão do líquido cefalorraquidiano.

A hiperqueratose das almofadinhas plantares e do focinho são outras lesões associadas ao CDV (Zachary & McGavin, 2011), tal como a pneumonia intersticial, a pneumonia broncointersticial e a broncopneumonia supurativa (Sonne *et al.*, 2009).

Também estão descritos casos de orquites e de epididimites responsáveis pelo decréscimo de espermatogénese, secreção prostática e testosterona nos machos infetados.

Os cães imunossuprimidos e geriátricos podem desenvolver encefalomielite designada por “*old dog encephalitis*” que pode afetar o tronco cerebral e a medula espinal, com infiltração linfoplasmocitária nos vasos sanguíneos das zonas de desmielinização (Lincoln, Gorham & Hegreberg, 1971; Axthelm & Krakowka, 1998). Estas zonas podem ser bastante extensas e, nos casos crónicos, há formação de placas de esclerose e substituição do tecido nervoso por astrócitos.

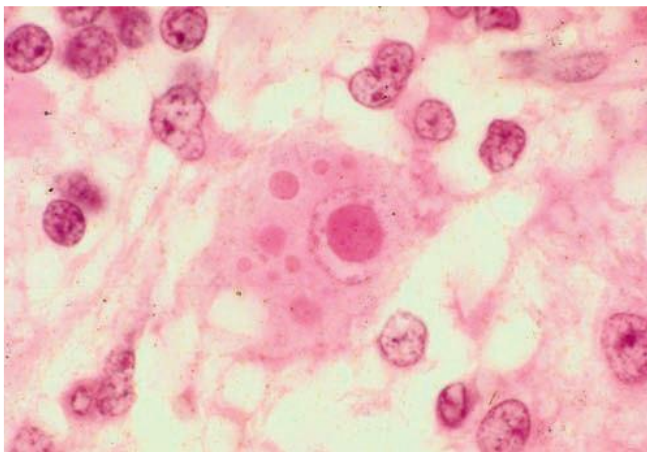


Figura 11. Neurónio com inclusões intracitoplasmáticas e intranucleares (retirado de Greene & Vandevelde, 2012)

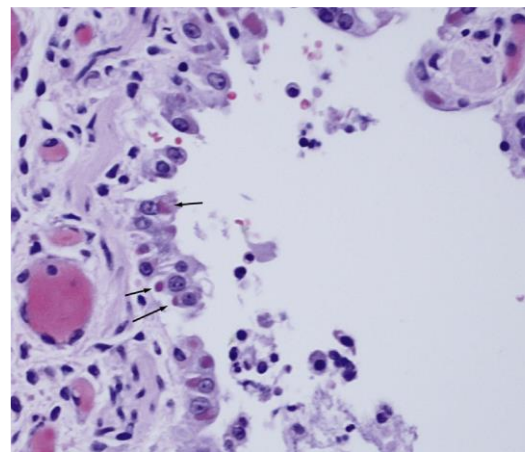


Figura 12. Epitélio respiratório com várias inclusões intracelulares representadas pelas setas (retirado de Sykes, 2014)

### 1.10. Prevenção

Estão disponíveis no mercado vários tipos de vacinas para imunizar cães contra a esgana: atenuadas; mortas e de subunidades. Estas vacinas apresentam-se associadas à vacina contra a parvovirose canina, a hepatite infecciosa canina e a leptospirose, esta última quase sempre com dois serovares *Leptospira canicola* e *Leptospira icterohaemorrhagiae*. Tratam-se, portanto, de vacinas polivalentes, não existindo atualmente em Portugal, uma oferta de vacinas monovalentes contra o CDV.

A transmissão de anticorpos das cadelas vacinadas à ninhada, ocorre sobretudo através da ingestão de colostro (97%) (Greene & Vandevelde, 2012). Esta proteção passiva, interfere com a administração de vacinas até ao período de desmame, que ocorre em média às seis semanas de idade. A indústria de produtos biológicos desenvolveu vacinas atenuadas, com títulos elevados do CDV, para imunizar cachorros nesta faixa etária, em situações de emergência, como cães com estilo de vida semilivre que residem em bairros/zonas onde esteja a deflagrar um surto epidémico de esgana, cachorros filhos de mãe não vacinada ou em cachorros filhos de mãe vacinada, mas que não tomaram colostro. Excetuando estas situações, o recomendado é aproveitar a 6ª e a 7ª semana de vida do cachorro para proceder à identificação animal (passaporte+*microchip*), à desparasitação interna e externa e para partilhar com o tutor indicações dietéticas e higiénicas. A primovacinação consta de três doses de vacina atenuada, administradas por via subcutânea, respetivamente à 8ª, 12ª e 16ª semana de vida, com um reforço ao primeiro ano de idade. Concluída esta primeira fase da vacinação, a recomendação do *Vaccination Guidelines Group* (VGG) da *World Small Animal Veterinary Association* (WSAVA, 2016) é a revacinação

dos cães de 3 em 3 anos. O calendário vacinal referido assenta nos seguintes factos: (i) às 16 semanas de vida já não há interferência de anticorpos maternos no desenvolvimento da resposta imunitária pós-vacinação, pois já foram todos depurados; (ii) o cachorro é plenamente imunocompetente às 16 semanas de vida; (iii) constatação de falhas vacinais em cachorros que receberam apenas duas doses na primovacinação, à 8ª e à 12ª semana de vida (WSAVA, 2016).

Nunca é demais enfatizar que apenas uma dose de vacina contra o CDV não protege o cachorro/cão, o mesmo sucedendo com programas vacinais incompletos, como por exemplo, ausência do reforço vacinal um ano após a primovacinação, ou não revacinar os cães adultos de 3 em 3 anos, pois como já referimos, apesar de a esgana canina ser sobretudo uma doença de cachorros, o CDV é capaz de infectar adultos.

As estirpes mais utilizadas na produção de vacinas atenuadas são a *Onderstepoort* e a *Rockborn* (a estirpe *Snyder Hill* é muito semelhante). A estirpe *Onderstepoort* foi adaptada a células e a embriões de galinha, induz baixos níveis de resposta humoral, mas não estão reportados episódios de doença pós-vacinal (Olsen, Klingeborn & Bonnett, 1997). A estirpe *Rockborn* foi obtida de células de rim de cão infectado, induz uma boa resposta imunitária e duradoura (Anis, Holford, Galyon & Wilkes, 2018).

Os casos reportados de encefalite pós-vacinal parecem estar relacionados com modificações genéticas ou recombinações da vacina com estirpes naturais. Cerca de 1 em cada 10.000 doses vacinais com a estirpe *Rockborn* ou *Snyder Hill* e 1 em 50.000 doses vacinais com a estirpe *Onderstepoort*, podem culminar em infeções sistémicas, encefalites em cadelas gestantes ou no pós-parto, e em cachorros. Os sinais neurológicos começam entre o 3º e o 20º dia pós-vacinação, e incluem o reflexo de *chewing-gum*, convulsões, paraparésia, tetraparésia e ataxia sensorial ou vestibular. Ao contrário da infeção natural com o CDV, estes sinais neurológicos podem estabilizar, regredir e até desaparecer com recurso a anti-inflamatórios e a terapia de suporte (Cornwell, Thompson, McCandlish, Macartney & Nash, 1988; Schultz, 2006).

Estão também documentados casos de osteodistrofia hipertrófica, principalmente em cães da raça *Weimaraner*, associados à administração de vacinas atenuadas polivalentes, incluindo CDV (Cuthbert, Morton & Lowrie, 2016). Esta doença é de etiologia multifatorial, sendo uma das possibilidades a vacinação contra o vírus da esgana, ou devido à ação direta do vírus ou do adjuvante utilizado. A gestão médica destes acidentes vacinais, é feita com suspensão da vacinação e terapia anti-

inflamatória, em doses imunossupressoras que se pode prolongar até quatro a seis semanas para evitar recaídas (Abeles, Harrus, Anger, Shalev, Aizenberg, Peres & Aroch, 1999; Harrus, Waner, Aizenberg, Safra, Mosenco, Radoshitzky & Bark, 2002).

Em Portugal as vacinas inativadas e as vacinas de subunidades, apesar de mais seguras, são pouco utilizadas, porque induzem durações de imunidade inferiores, obrigando à revacinação anual dos cães, o que acaba por torná-las mais caras, mas são a melhor opção para imunizar canídeos e mustelídeos silvestres mantidos em coleções de jardins zoológicos e de parques temáticos, espécies onde as estirpes atenuadas podem causar encefalite (Sykes, 2014).

No final do século XX desenvolveram-se vacinas recombinadas, nas quais o vírus da varíola do canário (canarypoxvirus) expressa as glicoproteínas H e F (Pardo, Bauman & Mackowiak, 1997). A segurança, a duração de imunidade (3 anos) e a possibilidade de vacinação de cadelas gestantes auguravam uma quota do mercado que nunca se verificou, provavelmente devido à opção dos médicos-veterinários por vacinas polivalentes com vírus atenuados.

Relativamente à imunidade humoral considera-se que os cachorros que ingeriram colostro materno, que revelem títulos de anticorpos  $\geq 100$  UI/ml, estão protegidos. Após vacinação, os cães com títulos de anticorpos  $\geq 20$  UI/ml, estão imunes ao CDV. Nos hospitais veterinários, sobretudo no continente americano, é prática rotineira a utilização de testes ELISA, para aferir de modo semiquantitativo ou quantitativo, o título de anticorpos dos cães face ao CDV, de modo a monitorizar o sucesso da vacinação e também para aferir os níveis de proteção de cães errantes de estatuto vacinal desconhecido, que tenham sido recolhidos por canis/abrigos (Waner, Mazar & Keren-Kornblatt, 2006; Latha, Geetha, Ramadass & Narayanan, 2007). Os resultados da titulação de anticorpos devem ser analisados em conjunto com outras variáveis como a idade, o estilo de vida do cão e a frequência da doença nas zonas geográficas onde o animal reside e frequenta (Vila Nova, Cunha, Sepúlveda, Oliveira, Braz, Tavares, Almeida & Gil, 2018).

### 1.11. Potencial impacto do CDV em Saúde Pública

Para discutir o potencial impacto do CDV em Saúde Pública, é necessário compará-lo ao vírus do sarampo, já que ambos são morbilivírus e induzem quadros lesionais semelhantes nos hospedeiros. De fato, há registros que uma estirpe do vírus do sarampo causa panencefalite esclerosante subaguda, muito semelhante à “*old dog encephalitis*” causada pelo CDV (Greene & Vandeveld, 2012). Observa-se desmielinização difusa e proliferação de células da glia, entre outros achados característicos de encefalite não supurativa. Como a desmielinização registrada na encefalite causada pelo CDV é muito similar à desmielinização observada na esclerose múltipla em humanos, colocou-se a hipótese do CDV estar envolvido na etiologia da esclerose múltipla. De fato, pessoas que sofrem de esclerose múltipla podem apresentar IgG e IgM contra este vírus, mas presume-se que seja por reação cruzada com o vírus do Sarampo (Almendra, 2005). Outras investigações refutaram a associação entre esclerose múltipla e CDV (Hodge & Wolfson, 1997), estando em curso ensaios para investigar a associação com outros vírus, como o paramyxovírus do sarampo e o herpesvírus, com a ocorrência da esclerose múltipla (Sanders, Felisan, Waddel & Tourtellote, 1996). Equaciona-se também o envolvimento do CDV na Doença de Paget, de etiologia desconhecida, que consiste num processo inflamatório crônico ósseo do Homem com destruição, remodelação e deformação dos ossos. O núcleo e o citosol dos osteoclastos lesados revelam inclusões virais, enquanto que os eritrócitos e osteoclastos contêm mRNA paramyxoviral. Além disso, recorrendo à hibridização *in situ*, foram identificadas sequências genéticas de CDV em ossos de 63,5% de pacientes com Doença de Paget não tratada (Cartwright, Gordon, Freemont, Anderson & Sharpe, 1993). Em outro estudo que também recorreu à hibridização *in situ*, foi detetado RNA do CDV em todas as lesões de pacientes com esta doença. Demonstrou-se também a capacidade do CDV replicar *in vitro* em osteoclastos humanos. Pensa-se que a variedade de resultados seja devido à utilização de testes de diagnóstico laboratorial com sensibilidades e especificidades diferentes. Ainda não foi excluída a hipótese de paramyxovirus como o vírus do sarampo, serem a causa ou o “gatilho” desta doença (Gordon, Anderson & Sharpe, 1991, Selby, Davies & Mee, 2006).

### III. Material e métodos

#### 1.1. Fontes de dados, critérios de inclusão e testes estatísticos

As fontes de dados foram as fichas clínicas armazenadas nos sistemas informáticos utilizados no HEV durante o período de estudo: Qvet e GuruVet; que depois foram completadas pelo candidato com informação disponível na base de dados da UIDI em *Microsoft Excel* 2016.

A UIDI é uma unidade do HEV destinada a internar, em rigorosas condições de biossegurança, animais suspeitos ou diagnosticados com doenças infecciosas.

Foram selecionados 49 cães, com histórico de internamento na UIDI, devido a suspeita clínica de esgana, no período de maio de 2015 a junho de 2018.

O critério de inclusão foi a presença de sinais clínicos compatíveis com esgana canina e/ou de exames de diagnóstico laboratorial positivos.

Na sequência da aplicação deste critério de inclusão, identificaram-se 29 cães (59,2%) com confirmação laboratorial de esgana e 20 cães (40,8%) “suspeitos de esgana” que foram mantidos na amostra, pois a evolução da doença e a resposta à medicação, reforçaram a suspeita clínica de infeção por CDV.

Três testes laboratoriais foram usados para confirmar a presença de infeção pelo CDV: ELISA, PCR e análise do LCR.

A análise exploratória dos dados e a estatística inferencial foi feita no programa R para Windows, versão 3.5.1. Os valores de frequência para amostras independentes foram analisados com o teste  $\chi^2$ . Em tabelas de contingência com valores observados inferiores a 5, foi utilizado o teste exato de Fisher para calcular o *p value* de forma a verificar a associação entre variáveis.

Foi utilizado o nível de significância de 5% em todos os testes estatísticos.

A georreferenciação dos casos de esgana foi feita no programa Epi Info™ para Windows versão 7.2.2.6.

## IV. Resultados

### 1.1 Localização geográfica dos casos de esgana

As coordenadas geográficas dos casos de esgana foram determinadas através do código postal da residência dos tutores dos cães.

A dispersão geográfica expressa na Figura 13 ilustra a facilidade com que o CDV se disseminou, provavelmente pelo contato de cães suscetíveis com cães errantes na fase infecciosa e/ou com produtos virulentos viáveis no ecossistema, como por exemplo nas margens do Rio Trancão, onde existem duas zonas de caça municipal, uma no município de Loures, outra no município de Lousa e Fanhões, frequentadas por matilhas de cães de caça.

O desconhecimento acerca das movimentações dos cães da amostra impediu analisar a influência desta variável na localização dos casos de esgana.

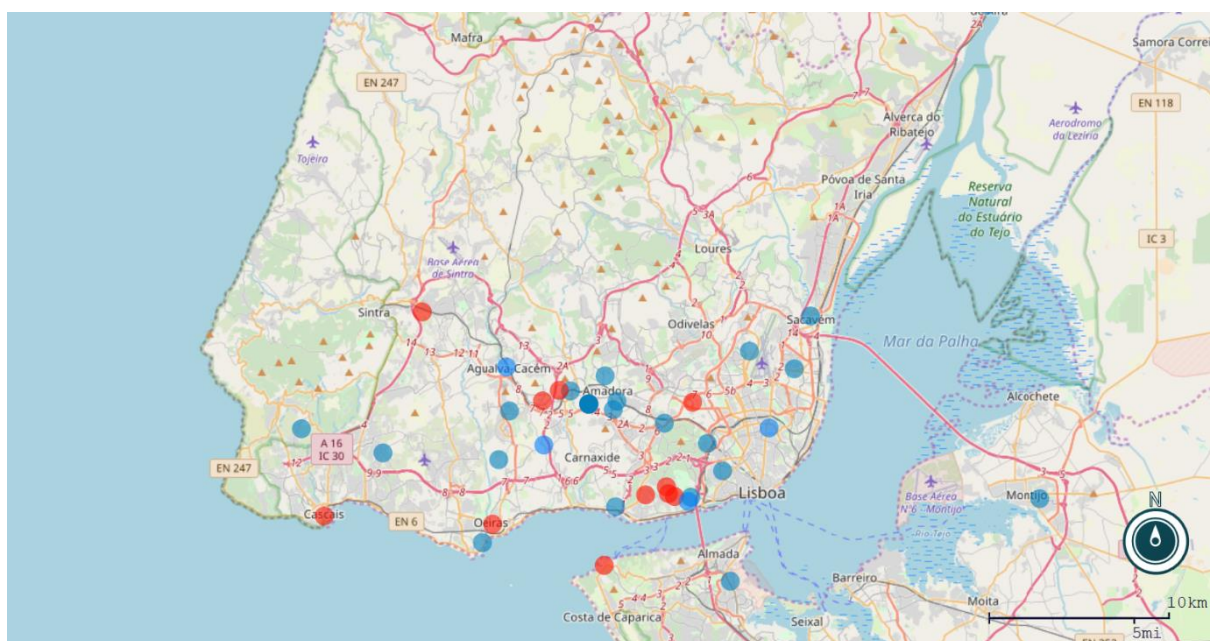


Figura 13. Localização geográfica dos casos investigados. A azul, os casos confirmados laboratorialmente e a laranja, os cães suspeitos clínicos mas sem confirmação laboratorial.

## 1.2. Sexo

Constatou-se uma maior frequência de casos nos machos (n=34), maior do que nas fêmeas (n=15) (Gráfico 1).



Gráfico 1. Distribuição dos casos de esgana por sexo e por diagnóstico de esgana.

Na Tabela 2 observa-se que as proporções de esgana em machos e fêmeas foram respetivamente de 58,8% e 60,0%, contudo estas diferenças não são significativas ( $\chi^2$ ;  $p=1$ ).

Sexo	Número total de casos	Proporção (%)	Número de casos confirmados	Frequência de casos confirmados (%)	IC <sub>95%</sub>
Masculino	34	69,4	20	58,8	42-74
Feminino	15	30,6	9	60,0	36-80
Total	49	100	29	59,2	45-72

Tabela 2. Análise comparativa dos casos confirmados de esgana por sexo.



### 1.3. Idade

Quatro cães foram excluídos da análise por a sua idade ser desconhecida.

No Gráfico 2 apresenta-se, em meses, a distribuição etária dos cães infetados que varia de 2 a 180 meses.

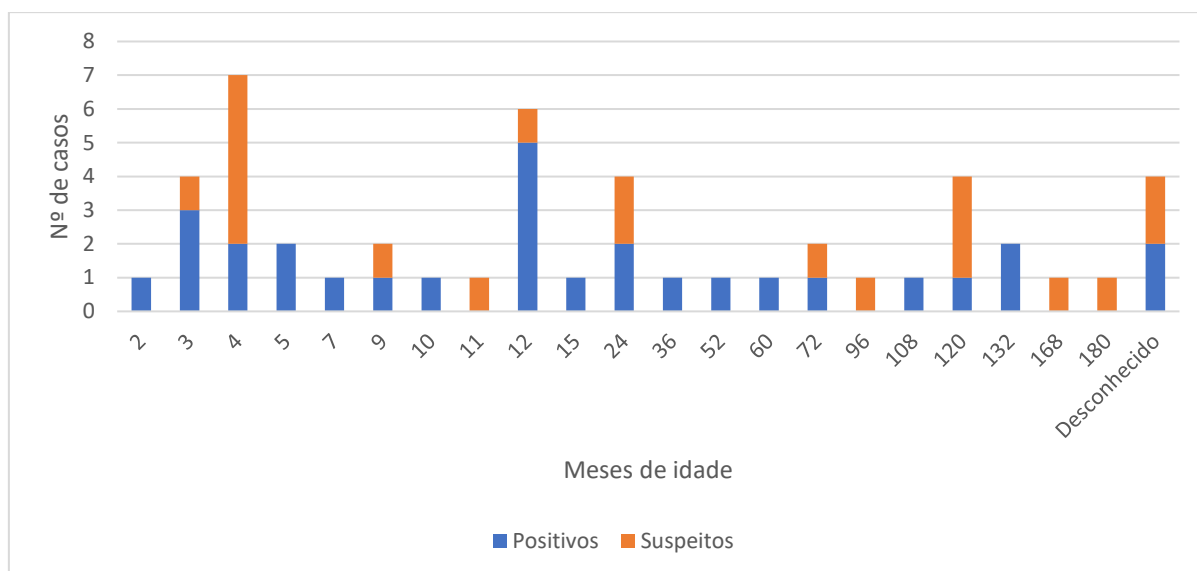


Gráfico 2. Distribuição etária dos casos de esgana e por diagnóstico de esgana.

A Tabela 3 reúne informação sobre as medidas de tendência central e de dispersão da idade dos cães investigados (n=45).

Variável Idade	
Média	41,5 meses
Moda	4,0 meses
Mediana	12,0 meses
Desvio padrão	51,3 meses
Coeficiente de variação	123,6 %

Tabela 3. Média, moda, mediana, desvio padrão e coeficiente de variação da idade dos cães investigados.

A mediana etária foi de 12 meses, porém a moda foi de 4 meses. Considerando a grande variabilidade na distribuição da idade dos cães investigados, agruparam-se os casos em três intervalos de classe: 2-12 meses, 13-48 meses e 49-108 meses (Tabela 4).

Idade (meses)	Número total de casos	Proporção (%)	Número de casos confirmados	Frequência de casos confirmados (%)	IC <sub>95%</sub>
2-12	25	55,6	16	64,0	45-80
13-42	6	13,3	4	66,7	30-90
42-108	14	31,1	7	50,0	27-73
Total	45	100	27	60,0	46-73

Tabela 4. Frequência de casos confirmados de esgana por escalão etário.

A frequência de casos confirmados de esgana em cães na classe de 2 a 12 meses foi de 64,0%, na classe de 13 a 48 meses foi de 66,7% e na classe de 49 a 108 meses foi de 50%. Não foram encontradas diferenças significativas na proporção de confirmados nas três classes etárias (Teste exato de Fisher,  $p=0,6884$ ). Porém a maioria dos casos estudados (55,6%, 22/45) foi registrada em cães jovens de 2 a 12 meses de idade.

#### 1.4. Raça

A amostra investigada reuniu 29 cães de raça indefinida e 20 raça definida (Gráfico 3).

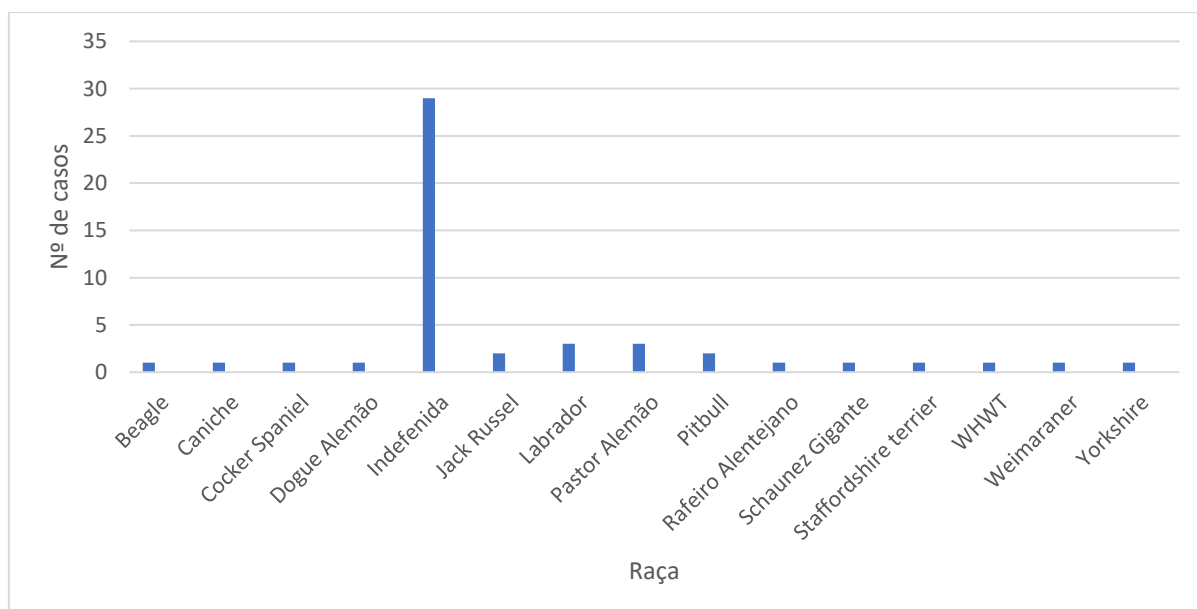


Gráfico 3. Distribuição dos casos de esgana por raça.

Raça	Número total de casos	% de casos	Número de casos confirmados	Frequência de casos confirmados (%)	IC <sub>95%</sub>
Definida	20	40,8	16	80,0	58-92
Indefinida	29	59,2	13	44,8	28-62
Total	49	100	29	59,2	45-72

Tabela 5. Frequência de casos confirmados de esgana em cães de raça definida versus indefinida.

A frequência de casos confirmados de esgana em cães de raça definida e indefinida foi de 80% e 44,8%, respectivamente (Tabela 5). Para esta variável há evidência de diferença significativa entre estas proporções (Teste exato de Fisher,  $p=0,03028$ ).

### 1.5. Sinais clínicos

Os sinais clínicos mais frequentes foram as mioclonias (42,9%), seguidas de prostração (38,8%), corrimento oculonasal (34,7%), sintomas gastrointestinais como vômito e diarreia (24,5%) e tosse (22,4%) (Gráfico 4).

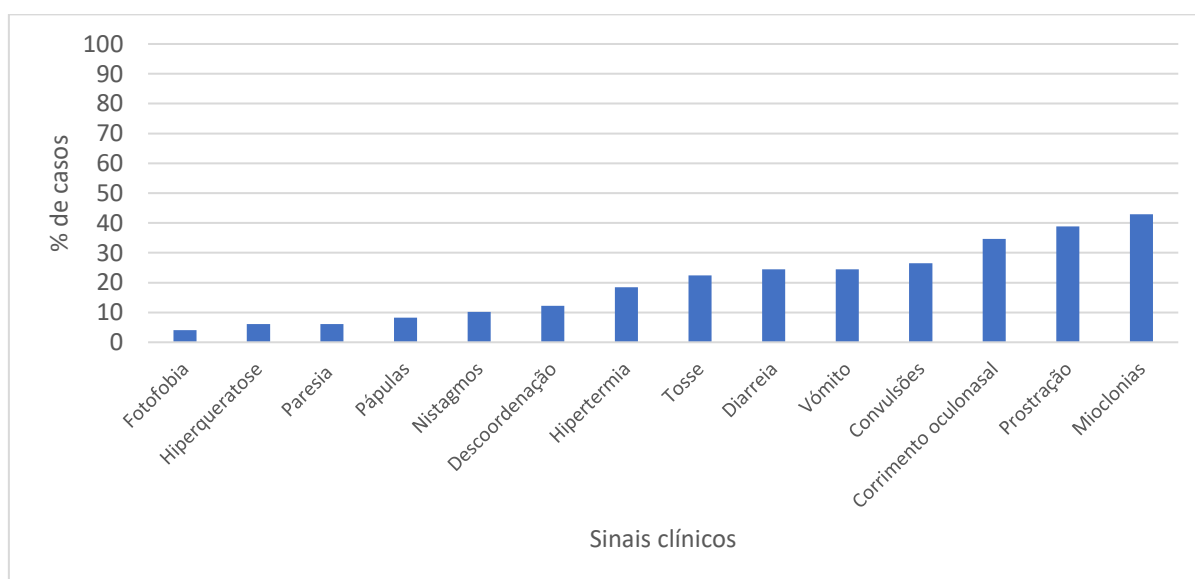


Gráfico 4. Frequência de sinais clínicos nos casos de esgana investigados.

A elevada frequência de mioclonias registada tanto pode espelhar uma ida tardia ao veterinário já numa fase de esgana nervosa ou uma estirpe de CDV com tropismo para o SNC.

### 1.6. Dias de internamento

É necessário interpretar com prudência estes resultados pois alguns cães tiveram altas precoces, por os tutores não puderem suportar os elevados custos de internamento na UIDI. O período de internamento mínimo foi de 1 dia enquanto que o período máximo foi de 20 dias. A média de dias de internamento necessários para a cura clínica do episódio de esgana foi de 4,57 dias. Desta forma tomou-se 5 dias como valor de comparação. Na Tabela 6 delimitaram-se dois intervalos de internamento: inferior ou igual a 5 dias; superior a 5 dias; para analisar a taxa de sobrevivência dos cães infetados.

Período de internamento	Número de cães	Número de cães vivos	Taxa de sobrevivência (%)
<5 dias	35	19	54,3
>5 dias	14	8	57,1

Tabela 6. Taxa de sobrevivência dos cães infetados.

Constata-se que os cães com menos dias de internamento tiveram uma taxa de sobrevivência inferior aqueles que beneficiaram de cuidados continuados por períodos superiores, 54,3% e 57,1%, respetivamente.

### 1.7. Estatuto vacinal

Doze cães foram excluídos da análise por não terem registos sobre o seu estatuto vacinal.

Para analisarmos o estatuto vacinal dos cães investigados, dividimo-los nas seguintes categorias, após análise detalhada dos registos de vacinação nas fichas clínicas: (i) cães vacinados (cumpriam as orientações da WSAVA); (ii) cães não-vacinados (ou nunca tinham sido vacinados ou estavam em incumprimento com as orientações da WSAVA).

A frequência de casos confirmados de esgana em cães vacinados foi de 83,3% (Tabela 7). No caso dos cães não-vacinados, a frequência de casos confirmados da doença foi de 58,1%. Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre estatuto vacinal e confirmação de doença (Teste exato de Fisher,  $p=0,3761$ ).

Estatuto vacinal	Número total de casos	Distribuição relativa (%)	Número de casos confirmados	Frequência de casos confirmados (%)	IC <sub>95%</sub>
Vacinado	6	16,2	5	83,3	43-97
Não-vacinado	31	83,8	18	58,1	41-74
Total	37	100	23		

Tabela 7. Frequência de casos confirmados de esgana por estatuto vacinal.

### 1.8. Taxa de sobrevivência

Embora a esgana canina seja uma doença associada a altas taxas de mortalidade, na UIDI a taxa de sobrevivência dos cães internados foi de 27/49 (55,1%) (Tabela 8), o que reforça a oportunidade de agir rapidamente face a uma suspeita clínica de esgana, recorrendo a terapêutica e a manejo de suporte adequados que permitam ao cão desencadear uma resposta imunitária eficaz. Estes valores são consistentes com os resultados de Machado (2016).

Taxa de sobrevivência	Confirmados laboratorialmente	Suspeitos clínicos	Confirmados + Suspeitos	Taxa de sobrevivência (%)
Vivos	14	13	27	55,1
Falecidos/Eutanasiados	15	7	22	44,9
Total	29	20	49	

Tabela 8. Taxa de sobrevivência dos cães internados na UIDI confirmados ou suspeitos clínicos de esgana.

### 1.9. Frequência mensal dos casos de esgana

Foi analisada a distribuição mensal dos casos de esgana em 2015, 2016, 2017 e 2018, e comparada com a temperatura e pluviosidade registada nos meses das ocorrências.

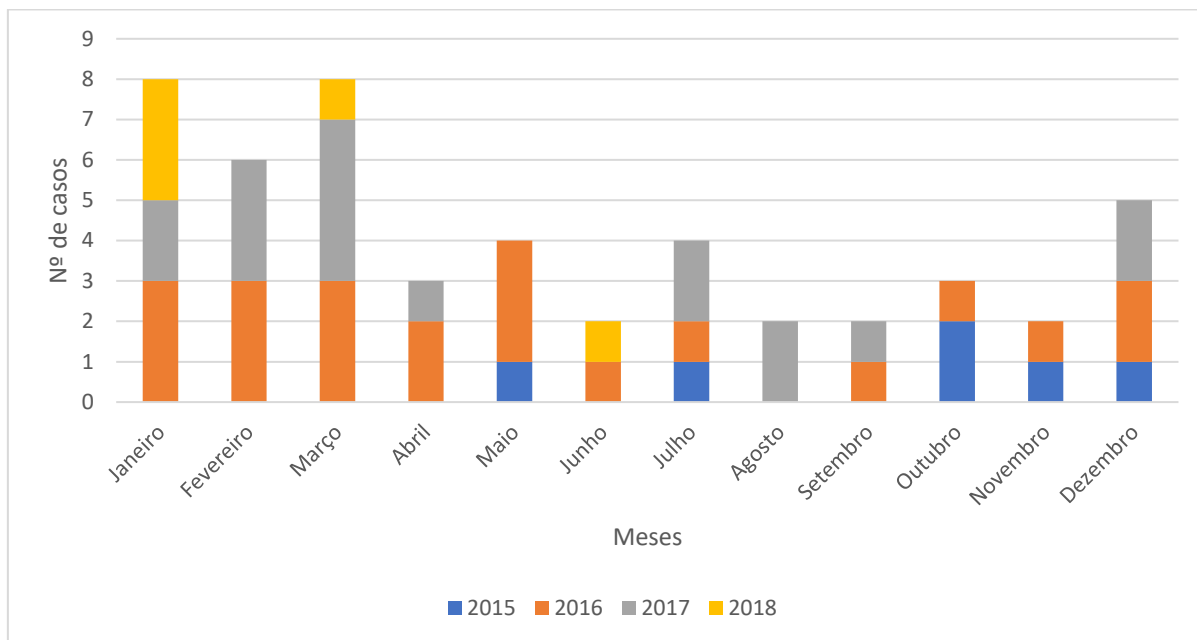


Gráfico 5. Frequência mensal de cães internados na UIDI de 2015 a 2018 com esgana confirmada ou suspeitos clínicos de esgana.

Os Gráficos 5, 6 e 7 revelam que os internamentos se distribuíram com maior frequência nos meses mais frios e húmidos: dezembro, janeiro, fevereiro e março.

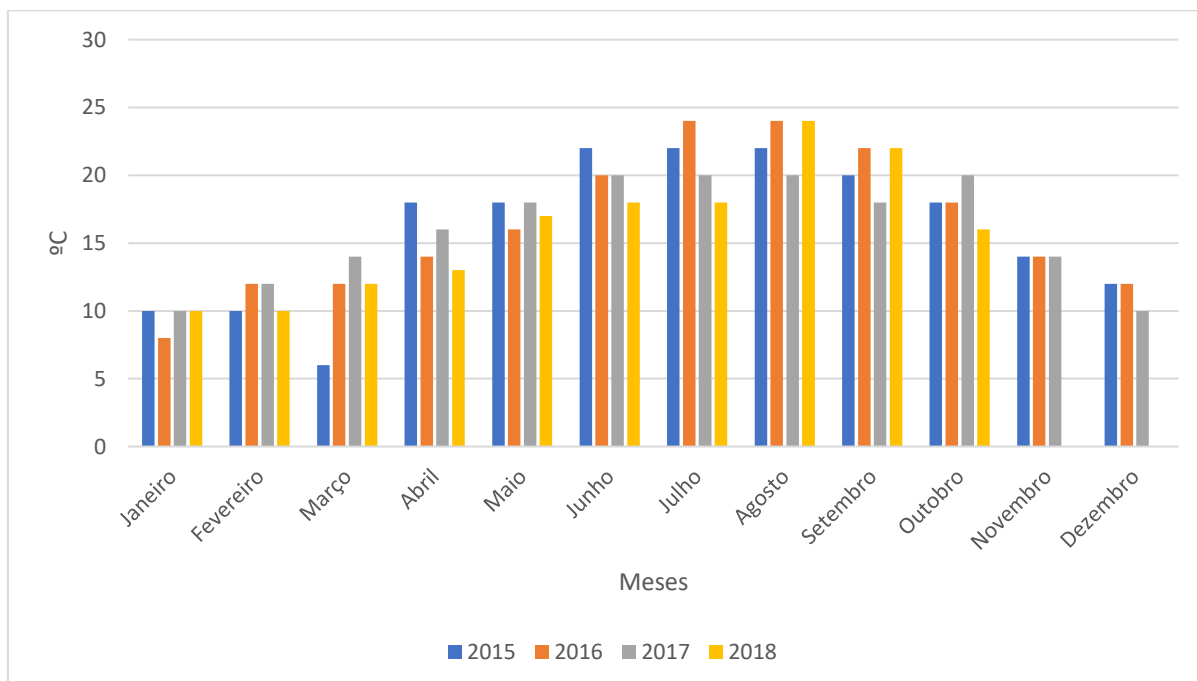


Gráfico 6. Temperaturas mensais médias no período 2015-2018 ([www.ipma.pt](http://www.ipma.pt)).

Isto é coerente com o fato de o CDV ser um vírus com envelope lipídico, pouco resistente a temperaturas elevadas e a humidades relativas baixas, tendendo a ser suprimido dos ecossistemas no Verão português.

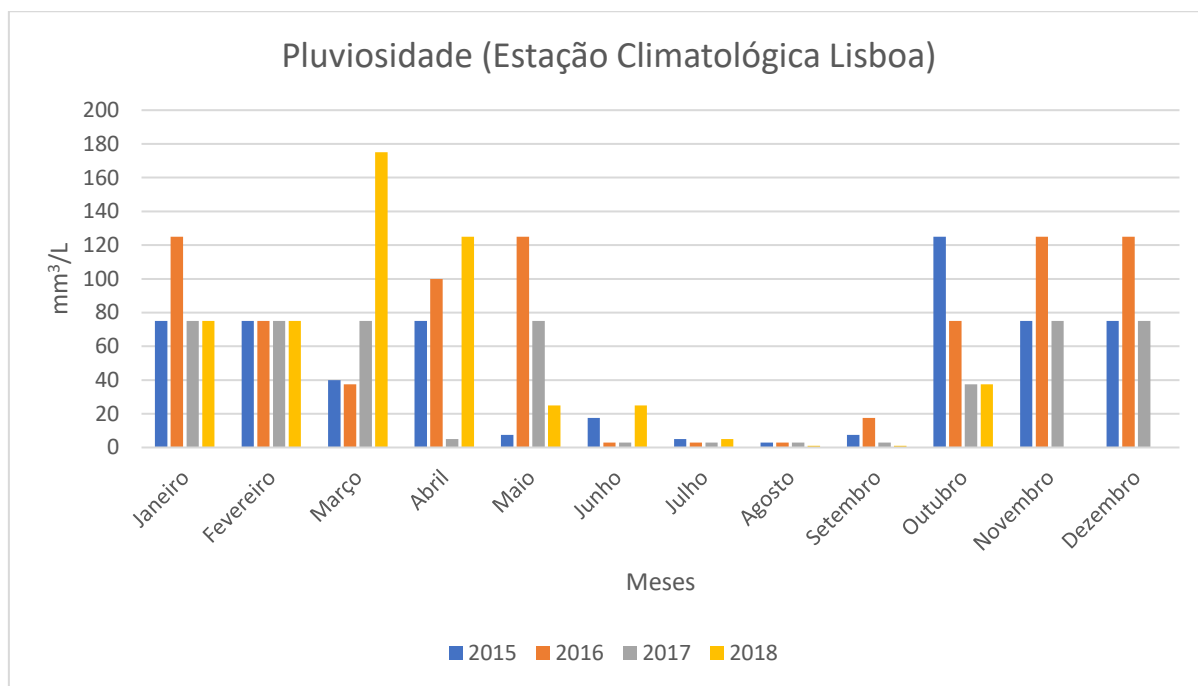


Gráfico 7. Pluviosidade mensal média no período 2015-2018 ([www.ipma.pt](http://www.ipma.pt)).

### 1.10. Métodos de diagnóstico laboratorial

O ELISA foi utilizado para investigar a presença/ausência de anticorpos contra esgana canina na circulação sanguínea. Foi o teste de diagnóstico laboratorial mais utilizado (n=35; 71,4%). Esta opção reflete a sua fácil realização, interpretação e baixo custo, apesar da desvantagem de não distinguir estirpes vacinais de selvagens (Gráfico 8).

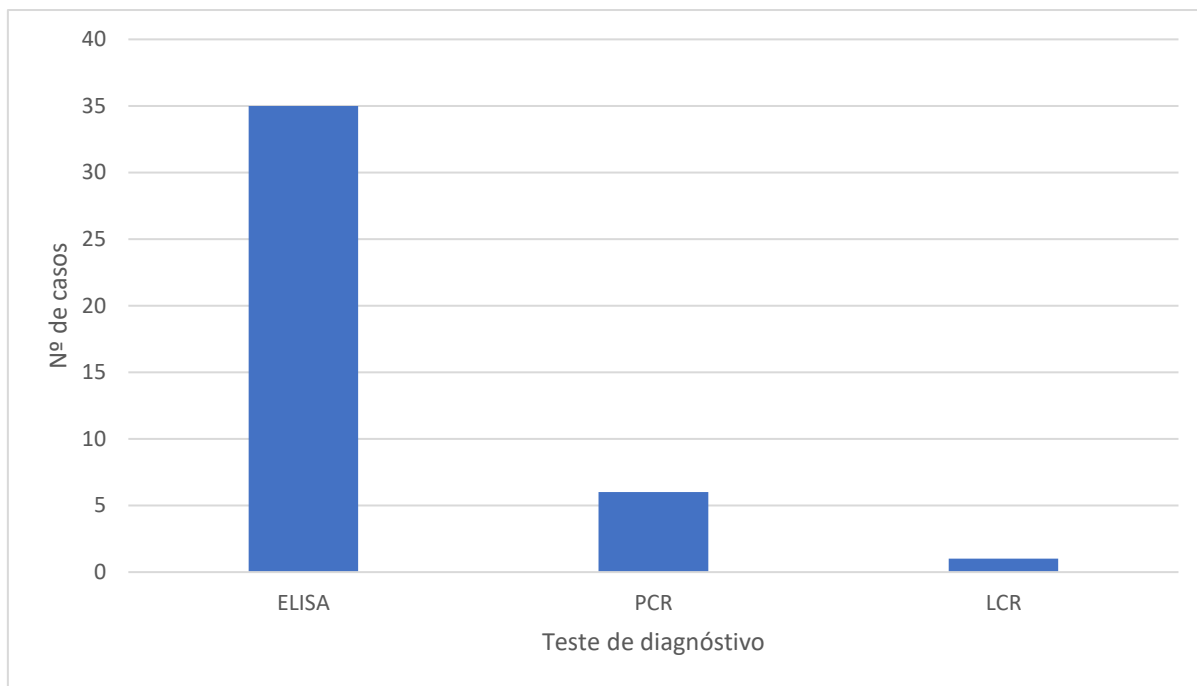


Gráfico 8. Frequência de testes laboratoriais.

Através do PCR foram analisados 6 casos de esgana (12,2%) e só num caso (2,0%) se recorreu a exame do LCR, devido aos perigos inerentes à recolha da amostra em cães com convulsões. Os diagnósticos dos restantes sete casos (14,4%) foram realizados nas clínicas/hospitais veterinários que referenciaram os seus pacientes para o HEV ou foram exclusivamente diagnósticos clínicos.



### 1.11. Rácio IgG/IgM

O ELISA é um teste com altos valores de sensibilidade e especificidade, muito utilizado na prática clínica e que fornece informação acerca das IgG e IgM. As IgM e as IgG surgem na fase aguda da doença, porém a IgG mantém-se mais tempo em circulação.

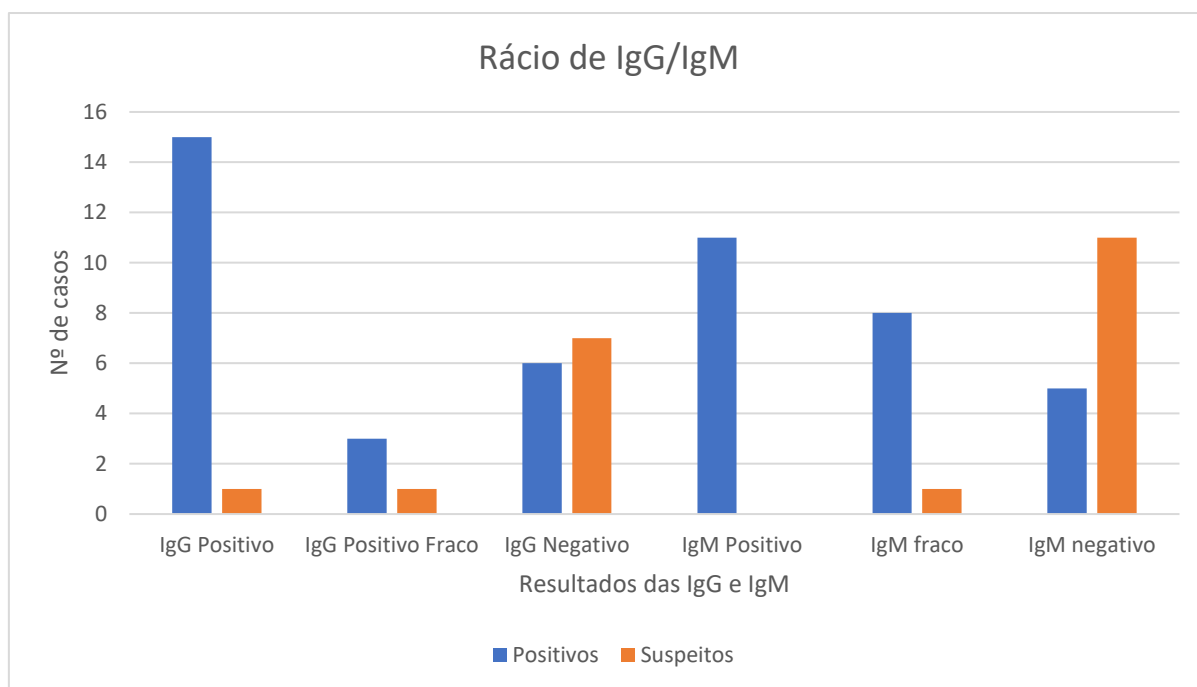


Gráfico 9. Rácio de IgG e IgM dos casos de esgana testados.

No Gráfico 9 são expressos os resultados da titulação das IgG e IgM dos cães testados. Dos 29 casos de esgana confirmados, 52% exibiam IgG enquanto 38% tinham IgM. Foram ainda considerados positivos, cães com IgG e/ou IgM negativos, 21% e a 17% respetivamente.

Os 20 cães suspeitos revelaram títulos de IgG e IgM que lhes conferiram o estatuto de não-infetados, mesmo com sinais clínicos compatíveis com esgana. Tal situação pode ser justificada pelo facto de serem necessários 6 a 8 dias para o cão desenvolver uma resposta humoral. Isto reforça a importância de um diagnóstico assertivo.

### 1.12. Análises clínicas

Foram compiladas 29 análises clínicas (Anexo 3) com os seguintes parâmetros: hematócrito, neutrófilos não segmentados, neutrófilos segmentados, linfócitos, monócitos e eosinófilos. Em 12 casos foi realizado um segundo hemograma.

Apenas 44,8% (n=13) dos casos tinham valores de hematócrito alterados numa primeira fase (Gráfico 10).

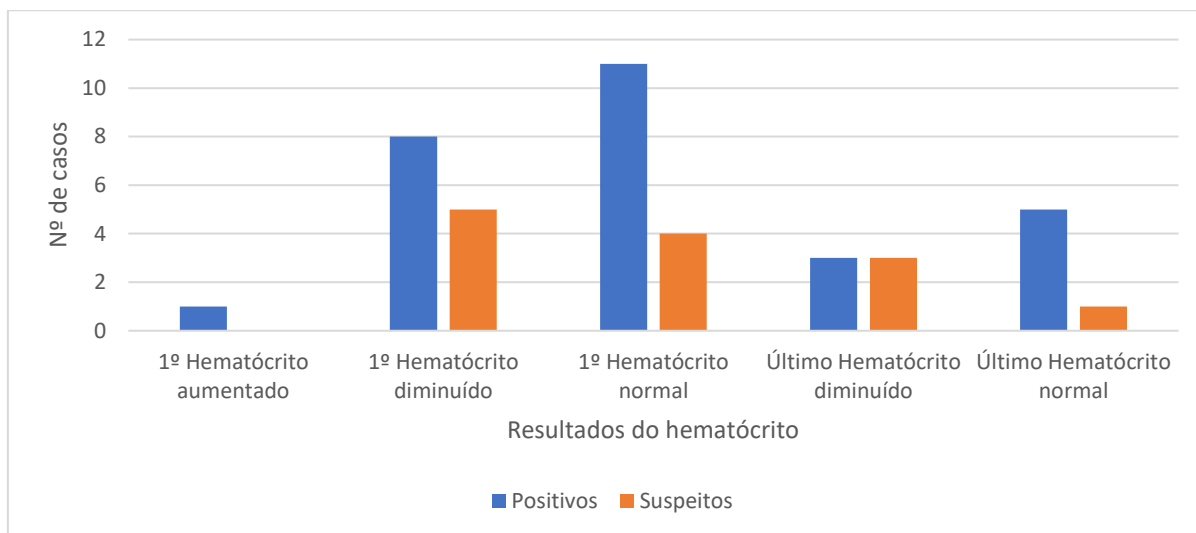


Gráfico 10. Resultados do primeiro e do último hematócrito.

Como se constata no Gráfico 11, apenas 13,8% dos casos (n=4) apresentavam desvio à esquerda enquanto que os restantes 86,2% (n=25) apresentavam valores de neutrófilos dentro dos parâmetros considerados normais (0-300/ $\mu$ L).

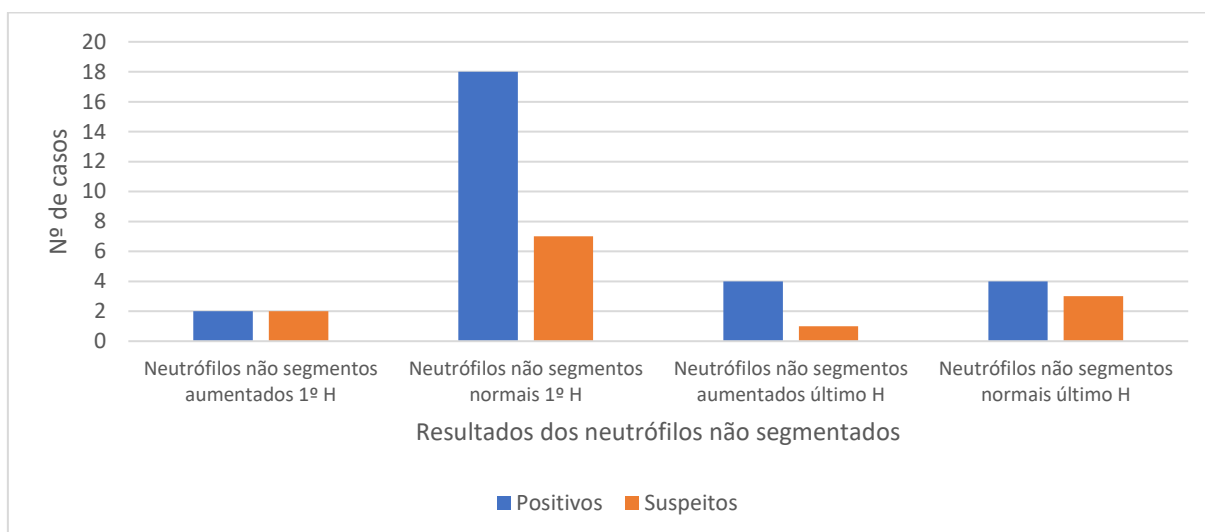


Gráfico 11. Frequência de neutrófilos não segmentados no primeiro e no último hemograma.

No último hemograma, 41,7% dos casos manifestavam valores aumentados dos neutrófilos.

No Gráfico 12 reúne-se os resultados relativos aos neutrófilos segmentados. 31,0% dos casos (n=9) apresentavam neutrofilia, 3,4% neutropénia (n=1) e os restantes casos exibiam valores normais (3000-11500/ $\mu$ L).

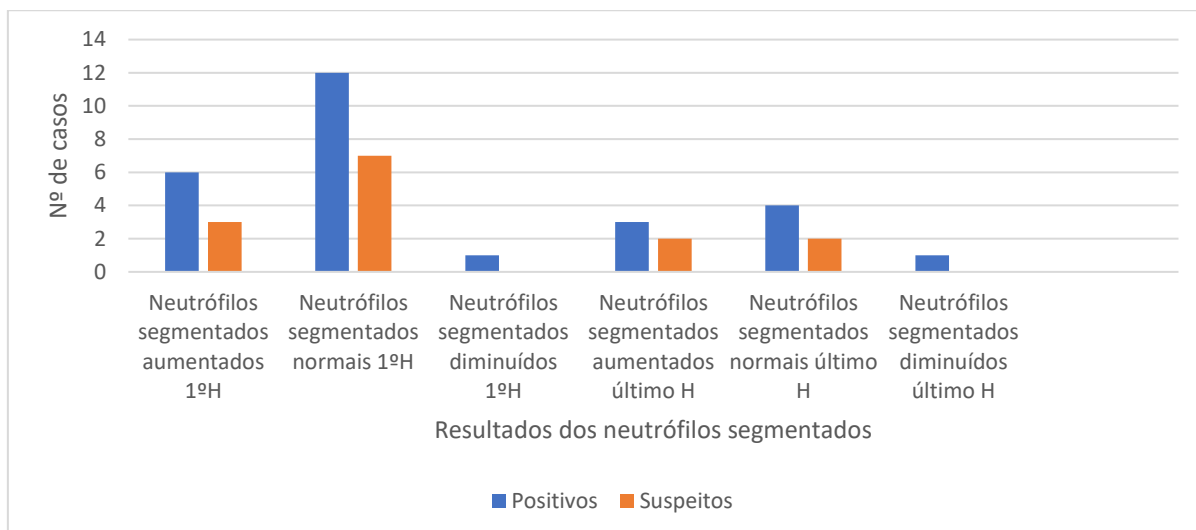


Gráfico 12. Frequência de neutrófilos segmentados no primeiro e no último hemograma.

No último hemograma, 50,0% dos casos continuavam com valores alterados dos neutrófilos segmentados.

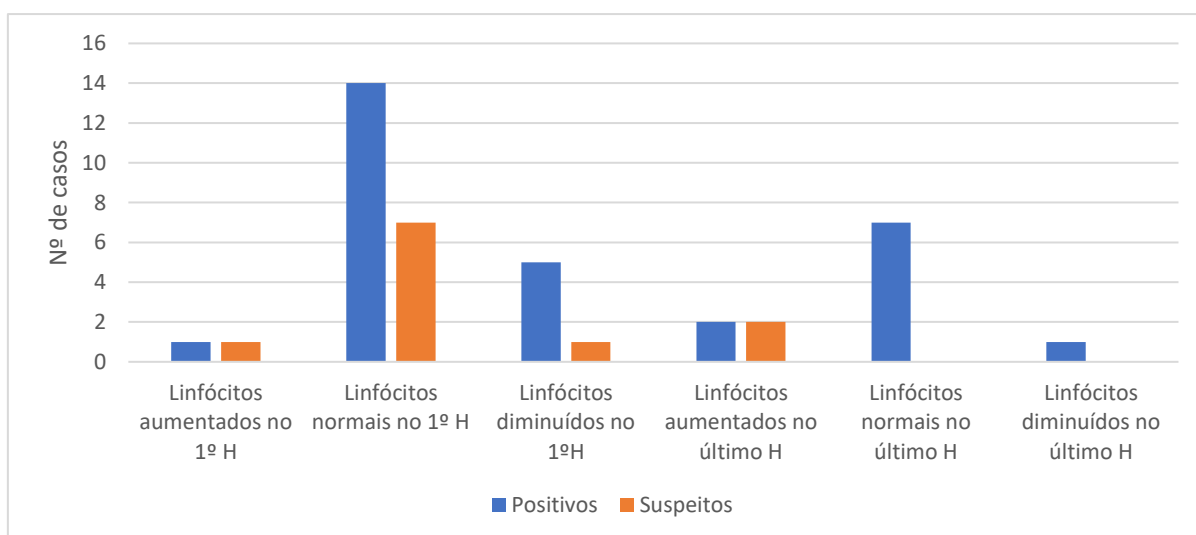


Gráfico 13. Frequência de linfócitos no primeiro e no último hemograma.

72,4% dos casos apresentavam valores normais de linfócitos (1000-4800/ $\mu$ L), sendo que 20,7% dos casos (n=6) apresentavam linfopénia e apenas 6,9%, linfocitose (n=2). No momento do último hemograma, 41,7% dos casos continuavam com valores alterados de linfócitos (Gráfico 13).

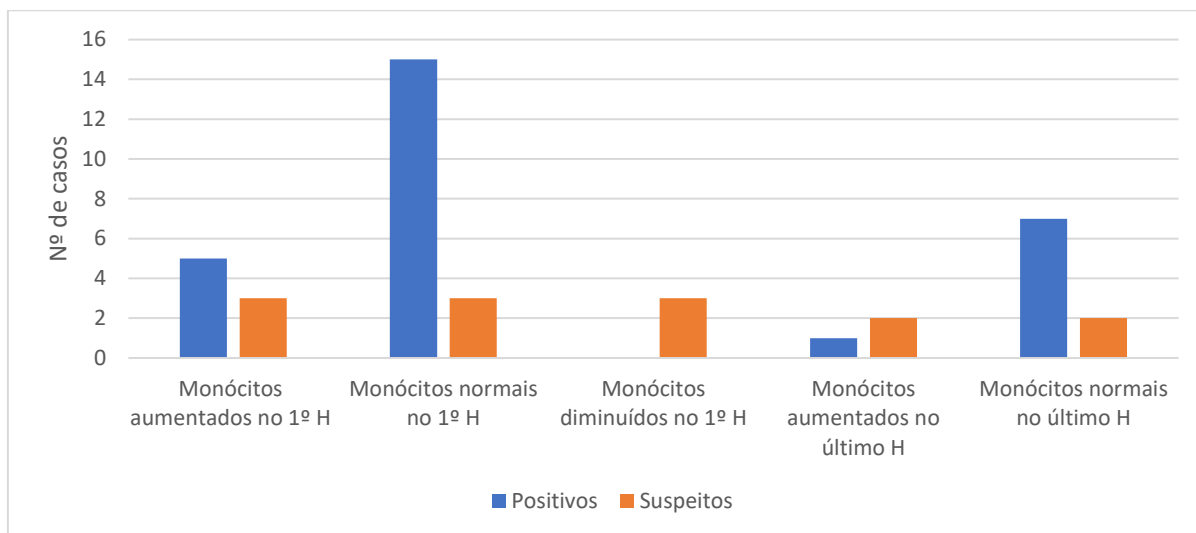


Gráfico 14. Frequência de monócitos no 1º e último hemograma.

Na primeira apresentação, 27,6% dos casos (n=8) apresentavam monocitose, 10,3% monocitopénia (n=3) e os restantes 62,1% valores normais de monócitos (150-1350/ $\mu$ L) (n=18). No último hemograma, 3 dos 12 casos analisados, continuavam com valores aumentados de monócitos (Gráfico 14).

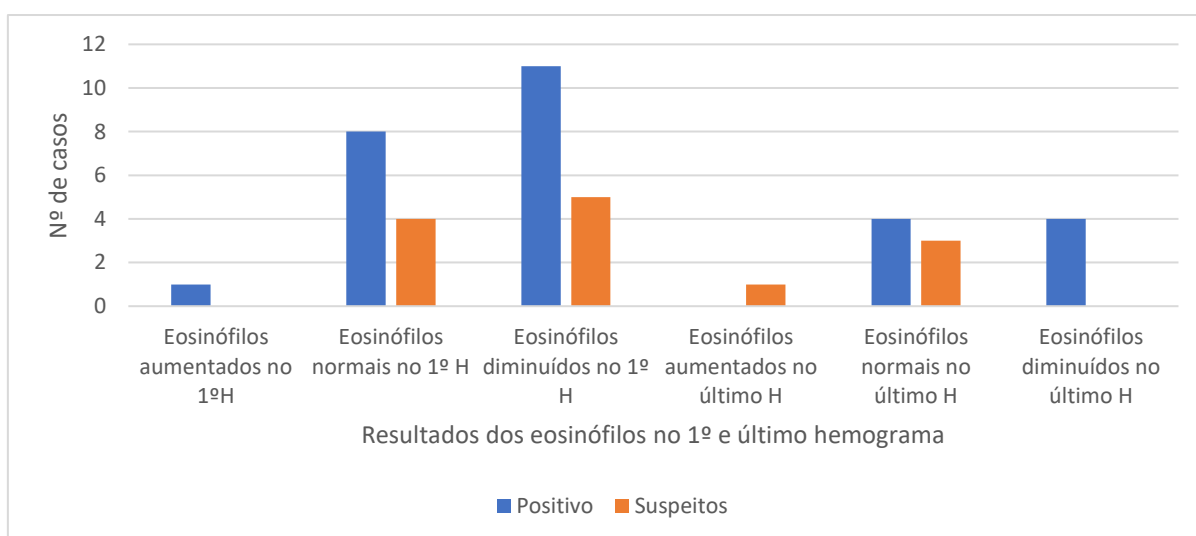


Gráfico 15. Frequência de eosinófilos no primeiro e no último hemograma.

Como se pode verificar no Gráfico 15, 55,2% dos cães (n=16) apresentavam valores diminuídos de eosinófilos, 3,4% (n=1) eosinofilia e 41,4% (n=12) revelaram valores normais (100-1250/ $\mu$ L). No último hemograma, 58,4% dos casos (n=7) exibiram valores normais, 33,3% eosinopenia (n=4) e 8,3% eosinofilia (n=1).

## V. Discussão dos resultados

A esgana canina é uma doença altamente contagiosa, com elevada taxa de mortalidade, que afeta uma grande quantidade de mamíferos. Neste estudo, o enfoque foi sobre o animal mais afetado em ambiente citadino, o cão. Foram investigados 49 casos de esgana canina, acompanhados na UIDI, georreferenciados em quatro concelhos da Zona Metropolitana de Lisboa e num concelho da margem sul do Tejo, no período de 2015-2018.

Apesar de o tamanho da amostra ( $n=49$ ) não permitir a identificação de tendências sazonais, constata-se que nos meses de maior humidade e menor temperatura, dezembro a março, foram diagnosticados mais casos de CDV. Esta observação é coerente com a baixa resistência do morbilivírus a elevadas temperaturas e sobretudo a ambientes secos. De fato, nos meses de junho a setembro, de fraca pluviosidade, registámos uma queda acentuada do número de casos suspeitos e confirmados. Este padrão sazonal repetiu-se durante o quadriénio investigado, com Verões muito secos que terão contribuído para limitar a dispersão do surto epidémico e a sua magnitude, mas que não foram suficientes para conduzir à sua extinção.

Registámos frequências de casos confirmados mais elevadas nas fêmeas (60,0%, 9/15) do que nos machos (58,8%, 20/34), mas não encontramos evidência de associação estatística entre o sexo dos animais e a confirmação laboratorial. Existem resultados contraditórios publicados na literatura científica. Assim, Headley & Graça (2000) e Guo, Everman, Foreyt, Knowlton & Windberg (1986) sugerem que as fêmeas são mais suscetíveis, enquanto Alex & Dhanapalan (1994) reportaram maior frequência de doença nos machos.

Em relação à variável “idade”, a mediana etária dos cães com esgana confirmada laboratorialmente foi de 1 ano, porém a variação dos dados é enorme, variando entre 2 meses e 9 anos, o que para além de influenciar a mediana, confirma a capacidade do CDV em infetar todos os grupos etários, incluindo cães adultos. O escalão etário com maior frequência de casos confirmados (66,7%) foi o dos 13 a 42 meses. Esta proporção diminui para 64,0% no escalão 2-12 meses e para 50,0% no escalão 48-108 meses. Na literatura consultada, a tendência é para a idade ser identificada como um fator de risco, já que os cães jovens são mais suscetíveis à infeção (Krakowka & Koestner, 1976; Ek-Kommonen, Sihvonen, Pekkanen, Rikula & Nuotio, 1997; Cleaveland, Appel, Chalmers, Chillingworth, Kaare & Dye 2000). Para evitar a infeção

dos cachorros deve-se implementar um calendário vacinal que inclui uma primovacinação com três doses (8<sup>a</sup>, 12<sup>a</sup> e 16<sup>a</sup> semana de vida do cachorro) e reforço 1 ano após. Posteriormente, a infecção de cães adultos é mitigada recorrendo à revacinação de 3-3 anos (WSAVA, 2016).

O fato de a esgana ser uma doença com várias formas clínicas: respiratória, gastrointestinal, nervosa e cutânea (Anexo 2) torna difícil a sua suspeita clínica e posterior diagnóstico laboratorial, sobretudo em zonas livres da doença ou onde só ocorrem casos esporádicos. Daí a vantagem de recorrer à ELISA para aferir os níveis de anticorpos dos cães de estatuto vacinal desconhecido ou que nunca foram vacinados. Este cenário complica-se nos cães vacinados, pois torna-se necessário pesquisar a presença do vírus, recorrendo à análise do LCR.

Quanto aos sinais clínicos apresentados pelos cães investigados (n=49), destacamos a elevada frequência de mioclonias (42,9%), seguida por prostração (38,8%), corrimento oculonasal (34,7%), sinais gastrointestinais como vômito e diarreia (24,5%) e tosse (22,4%). Esta diversidade de sinais clínicos reforça de novo a dificuldade da suspeita clínica da doença, sobretudo em áreas geográficas onde o CDV se manteve em silêncio epidemiológico durante décadas, como foi o caso na Área Metropolitana de Lisboa.

A média de dias de internamento dos cães na UIDI foi de 4,6 dias (valor mínimo de 1 dia e máximo de 20 dias). A taxa de sobrevivência foi de 54,3% (em períodos de internamento < 5 dias) e de 57,1% (em períodos de internamento ≥ 5 dias). Estes indicadores foram influenciados por altas clínicas precoces resultantes de limitações financeiras dos tutores, do estado avançado do decurso clínico da doença agravado pela presença de sinais neurológicos em 42,9% dos casos, e culminando na morte dos cães em 44,9% das situações.

Os cães investigados tinham programas vacinais muito díspares, desde vacinação completa para esgana, hepatite infecciosa, parvovirose e leptospirose (CHPL), apenas primovacinação para CHPL, apenas a vacinação antirrábica obrigatória e ausência de vacinação. Nos cães cuja proteção face ao CDV foi considerada insuficiente ou inexistente, a frequência de doença foi de 58,1% (18/31). Este resultado reforça a necessidade crescente do cumprimento escrupuloso do calendário de vacinação recomendado internacionalmente. Enfatizamos e recordamos que 63,3% dos cães estudados não estavam vacinados segundo o critério adotado. Quanto à elevada

frequência de casos confirmados em cães vacinados (83,3%), esta pode dever-se quer a falhas vacinais relacionadas com o animal, por exemplo interferência com anticorpos maternos, imunodeficiência inata ou adquirida, fatores determinantes associados à raça, quer com a vacina usada, por exemplo baixa concentração do antígeno, baixa capacidade imunogénica, elevado grau de atenuação ou administração incorreta.

Quanto às análises clínicas, dos 29 casos 44,8% entraram na UIDI com valores baixos de hematócrito, 3,4% com aumento dos neutrófilos não segmentados, 31,0% com neutrófila, 3,4% com neutropénia, 6,9% com linfocitose, 20,7% com linfopénia, 27,6% com monocitose, 10,3% com monocitopénia, 3,4% com eosinofilia e 55,2% com eosinopénia.

Por fim, cães de raça determinada tiveram uma frequência de confirmação de 80% (16/20) enquanto que cães de raça indeterminada tiveram uma frequência de confirmação de 44,8% (13/29), mas a associação estatística encontrada deve ser interpretada com muita prudência, quer devido ao reduzido tamanho da amostra, quer à inconsistência dos resultados disponíveis na literatura internacional.

## VI. Conclusão

A vacinação de cachorros com vacinas atenuadas polivalente que incluem o CDV, na Zona Metropolitana de Lisboa, a partir dos anos 70, levou ao controlo da infeção na espécie canina, tendo sido registados casos esporádicos e surtos epidémicos, reportados de forma informal entre a comunidade de médicos veterinários de animais de companhia e as empresas que comercializam vacinas, mas carenciados de investigação de foco adequada. O fato de ter ocorrido um novo surto de esgana canina, em Loures em 2015, motivou a seleção do tema da presente dissertação.

A ausência de investigação de surtos epidémicos de esgana canina em outras zonas do país, agrava esta ausência de conhecimento e impede a identificação de agregados geográficos (*clusters*) da doença, a deteção precoce da circulação de novas estirpes do CDV, e sobretudo, a caracterização do estado vacinal dos animais infetados.

Os resultados do presente estudo reforçam a necessidade imperativa de encorajar os médicos veterinários dos animais de companhia, a seguirem as recomendações da WSAVA, relativas aos calendários de vacinação a implementar no cão, a saber uma primovacinação com três doses (8<sup>a</sup>, 12<sup>a</sup> e 16<sup>a</sup> semana de vida), reforço após um ano e revacinação dos adultos a cada 3 anos.

Noutro âmbito, os tutores dos cães devem ser informados da importância do rigoroso cumprimento destas vacinações, e do impacto que a sua negligência pode ter, pois cães com um programa vacinal incompleto podem contrair a doença, mesmo em adultos, como se constatou no surto epidémico que investigámos. O recurso a aplicações informáticas que emitem automaticamente lembretes alertando para a proximidade das datas de vacinação, com envio de correios eletrónicos ou de mensagens nas redes sociais devem ser potenciados ao máximo.

É também crucial, confirmar laboratorialmente as suspeitas clínicas, com a seleção da amostra biológica apropriada e acondicionamento adequado, como zaragatoas retais e ocular-nasais, assim como sangue e urina, para realização da PCR.

É fulcral partilhar a informação de ocorrência de um caso/foco de esgana canina entre a comunidade veterinária, pois o CDV pode ser rapidamente disseminado por matilhas de cães errantes, canídeos e mustelídeos silvestres, e por cães com estilos de vida associados a elevada mobilidade geográfica, como os cães dos caçadores.



## VII. Bibliografia

- Abeles, V., Harrus, S., Anger J.M., Shalev, G., Aizenberg, I., Peres, Y & Aroch, I. (1999). Hypertrophic osteodystrophy in six weimaraner puppies associated with systemic signs. *Veterinary Record*, 145(5), 130–134.
- Aguiar, D.M., Amude, A.M., Santos, L.G.F., Ribeiro, M.G., Ueno, T.E.H., Megia, J., Paes, A.C., Alfieri, A.A. & Gennari, S.M. (2012). Canine distemper virus and *Toxoplasma gondii* co-infection in dogs with neurological signs. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 64(1), 221–224.
- Alex, P.C. & Dhanapalan, P. (1994). Distemper encephalitis in dogs: incidence, symptomatology and electroencephalographic findings. *Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 25, 127-31.
- Almendra, C. (2005). *Potencial papel do Vírus da Esgana Canina na etiologia da Esclerose Múltipla: avaliação serológica*. Dissertação de Mestrado. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa.
- Alves, C.M., Vasconcelos, A.C., Martins, A.S., del Puerto, H.L., Santos, F.G.A., Nunes, J.E.S., Campos, P.P. & Moro, L. (2006). Morphometric analysis of the thymus of puppies infected with the Snyder Hill Strain of canine distemper virus. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 58(4), 472–479.
- Amude, A.M., Alfieri, A.A. & Alfieri, A.F. (2007). Clinicopathological findings in dogs with distemper encephalomyelitis presented without characteristic signs of the disease. *Research in Veterinary Science*, 82(3), 416–422.
- An, D.J., Kim, T.Y., Song, D.S., Kang, B.K. & Park, B.K. (2008). An immunochromatography assay for rapid antemortem diagnosis of dogs suspected to have canine distemper. *Journal of Virological Methods*, 147(2), 244–249.
- Anis, E., Holford, A.L., Galyon, G.D. & Wilkes, R.P. (2018). Antigenic analysis of genetic variants of Canine distemper virus. *Veterinary Microbiology*, 219, 154–160.
- Appel, M.J., Pearce-Kelling, S. & Summers, B. A. (1992). Dog lymphocyte cultures facilitate the isolation and growth of virulent canine distemper virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 4(3), 258–263.

- Axthelm, M.K. & Krakowka, S. (1998). Experimental old dog encephalitis (ODE) in a gnotobiotic dog. *Veterinary Pathology*, 35(6), 527–534.
- Bathen-Noethen, A., Stein, V.M., Puff, C. & Baumgaertner, W. (2008). Magnetic resonance imaging findings in acute canine distemper virus infection. *Journal of Small Animal Practice*, 49(9), 460–467.
- Beineke, A., Puff, C., Seehusen, F. & Baumgartner, W. (2009). Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 127(1–2), 1–18.
- Beineke, A., Baumgartner, W. & Wohlsein P. (2015). Cross-species transmission of canine distemper virus-an update. *One Health* 1, 49–59.
- Brown, R. A. L., Morrow, A., Heron, I. & Chong, S.N. (1987). Immunocytological confirmation of a diagnosis of canine distemper using cells in urine. *Journal of Small Animal Practice*, 28, 845–851.
- Cartwright, E.J., Gordon, M.T., Freemont, A.J., Anderson, D.C. & Sharpe, P.T. (1993). Paramyxoviruses and Paget's disease. *Journal of medical virology* 40(2), 133–141.
- Carvalho, O.V., Botelho, C.V., Ferreira, C.G.T., Scherer, P.O., Soares-Martins, J.A.P., Almeida, M.R. & Júnior, A.S. (2012). Immunopathogenic and neurological mechanisms of canine distemper virus. *Advances in Virology*, Volume 2012, 1–10.
- Carvalho, O.V., Félix D.M., Tozado, C.C., Fietto, J.L.R., de Almeida, M.R., Bressan, G.C., Pena, L.J. & Silva-Júnior, A. (2017). 6-Methylmercaptapurine riboside, a thiopurine nucleoside with antiviral activity against canine distemper virus in vitro. *Virology Journal*, 14, 124.
- Cho, H.S. & Park, N.Y. (2005). Detection of canine distemper virus in blood samples by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Veterinary Medicine Series B: Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 52(9), 410–413.
- Cleaveland, S., Appel, M.G.J., Chalmers, W.S.K., Chillingworth, C., Kaare, M. & Dye, C. (2000). Serological and demographic evidence for domestic dogs as a source of canine distemper virus infection for Serengeti wildlife. *Veterinary Microbiology* 72 (3-4), 217–227.

- Cuthbert, S., Morton & M., Lowrie, M. (2016) Immunodeficiency syndrome in a Weimaraner involving the peripheral nervous system. *Veterinary Record Case Reports*, 4.
- Colorado State University, Veterinary Diagnostic Laboratories. Acedido em setembro 8, 2018, em: <http://csu-cvmb.colostate.edu/vdl/Pages/four-cases-canine-distemper-pneumonia-in-neonatal-pups.aspx>
- Cornwell, H.J., Thompson, H., McCandlish, I.A., Macartney, L. & Nash, A. S. (1988). Encephalitis in dogs associated with a batch of canine distemper (Rockborn) vaccine. *The Veterinary Record*, 122(3), 54–59.
- Coyne, M.J, Burr, J.H.H., Yule, T.D., Harding, M.J., Tresnan, D.B. & McGavin D. (2001). Duration of immunity in dogs after vaccination or naturally acquired infection. *Veterinary Record*, 149, 509–515.
- De Almeida, D.E., Roveratti, C., Brito, F.L.C., Guilherme, G.S., Duque, J.C.M., Bechara, G.H. & Laus, J.L. (2009). Conjunctival effects of canine distemper virus-induced keratoconjunctivitis sicca. *Veterinary Ophthalmology*, 12(4), 211–215.
- Deem, S.L., Spelman, L.H., Yates, R.A. & Montali, R.J. (2000). Canine distemper in terrestrial carnivores: a review. *Journal of Zoo and Wildlife*, 31(4), 441–451.
- Ek-Kommonen, C., Sihvonen, L., Pekkanen, K., Rikula, U. & Nuotio, L. (1997). Outbreak of canine distemper in vaccinated dogs in Finland. *Veterinary Record*, 141, 380–383.
- Gama, F.G., Santana, A.E., Filho, C. & Nogueira, C.A. (2007). Agarose gel electrophoresis of cerebrospinal fluid proteins of dogs after sample concentration using a membrane microconcentrator technique. *Veterinary Clinical Pathology*, 36(1), 85–88.
- Gámiz, C., Martella, V., Ulloa, R., Fajordo, R., Quijano-Hernández, I. & Martínez, S. (2011). Identification of a new genotype of canine distemper virus circulating in America. *Veterinary Research Communications*, 35(6), 381–390.
- Gordon, M.T., Anderson, D.C. & Sharpe, P.T. (1991). Canine distemper virus localised in bone cells of patients with Paget 's disease. *Bone* 201, 195–201.

- Greene, C.E. & Vandevelde, M. (2012). Canine Distemper. In C.E. Greene (Ed.), *Infectious diseases of the dog and cat* (4th ed.). (pp-25-42). Philadelphia: Saunders Elsevier Co.
- Griffin, J.F., Young, B.D. & Levine, J.M. (2009). Imaging diagnosis - Chronic canine distemper meningoencephalitis. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, 50(2), 182–184.
- Guo, W., Everman, J.F., Foreyt, W.J., Knowlton, F.F. & Windberg, L.A. (1986). Canine distemper virus in coyotes: a serological survey. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 189(9), 1099–1100.
- Haines, D.M., Martin, K.M., Chelack, B.J., Sargent, R.A., Outerbridge, C.A. & Clark, E.G. (1999). Immunohistochemical detection of canine distemper virus in haired skin, nasal mucosa, and footpad epithelium: A method for antemortem diagnosis of infection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 11(5), 396–399.
- Harrus, S., Waner, T., Aizenberg, M.R., Safra, N., Mosenco, A., Radoshitzky, M. & Bark, H. (2002). Development of hypertrophic osteodystrophy and antibody response in a litter of vaccinated Weimaraner puppies. *Journal of Small Animal Practice*, 43 (1) 27–31.
- Headley, S.A. & Graça, D.L. (2000). Canine distemper: epidemiological findings of 250 cases. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 37, 136–140.
- Hodge M.J. & Wolfson, C. (1997). Canine distemper virus and multiple sclerosis. *Neurology*, 49 (Suppl): S62-S69.
- Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA) (2018). Acedido em novembro 14, 2018, em: <http://www.ipma.pt/pt/publicacoes/boletins.jsp?cmbDep=cli&cmbTema=pcl&idDep=cli&idTema=pcl&curAno=-1>
- Kapil, S., Allison, R.W., Johnston, L., Murray, B.L., Holland, S., Meinkoth, J. & Johnson, B. (2008). Canine distemper virus strains circulating among North American dogs. *Clinical and Vaccine Immunology*, 15(4), 707–712.

- Kerdiles, Y.M., Cherif, B., Marie, J.C., Tremilon, N., Blanquier, B., Libeau, G., Diallo, A., Wild, T.F., Villiers, M.B. & Horvat, B. (2006). Immunomodulatory properties of Morbillivirus Nucleoproteins. *Viral Immunology*, 19(2), 324–334.
- Krakowka, S. & Koestner, A. (1976). Age-related susceptibility to infection with canine distemper virus in gnotobiotic dogs. *The Journal of Infectious Diseases* 134(6), 629–632.
- Kubo, T., Kagawa, Y., Taniyama, H. & Hasegawa, A. (2008). Retrospective serological analysis of spontaneous CDV infection in 192 dogs. *The Journal of veterinary medical science*, 70(5), 475–477.
- Kuehn, B.M. (2004). Multi disciplinary task force tackles Chicago distemper outbreak. Questions raised about vaccination. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 225(9), 1315–1317.
- Latha, D., Geetha, M., Ramadass, P. & Narayanan, R.B. (2007). Evaluation of ELISA based on the conserved and functional middle region of nucleocapsid protein to detect distemper infection in dogs. *Veterinary Microbiology*, 120(3–4), 251–260.
- Lempp, C., Spitzbarth, I., Puff, C., Armend, C., Kegler, K., Techangamsuwan, S., Baumgärtner, W. & Seehusen, F. (2014). New aspects of the pathogenesis of canine distemper leukoencephalitis. *Viruses*, 6(7), 2571–2601.
- Lincoln, S.D., Gorham, J.R., Ott, R.L. & Hegreberg, G.A. (1971). Etiologic studies of old dog encephalitis: I. Demonstration of canine distemper viral antigen in the brain in two cases. *Veterinary Pathology*, 8(1), 1–8.
- Machado, I.C. (2016). *Frequência de doenças infecciosas em carnívoros domésticos hospitalizados na unidade isolamento do Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa de Outubro de 2013 a janeiro de 2016*. Dissertação de mestrado. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa. <https://www.repository.utl.pt/handle/10400.5/12511>
- MacLachlan, N.J. & Dubovi, E.J. (2016). *Fenner's Veterinary Virology*. London: Saunders Elsevier Co.
- Martella, V., Elia, G. & Buonavoglia, C. (2008). Canine Distemper Virus. *Veterinary Clinics of North America*, 38(4), 787–797.

- Mee, A.P., Webber, D.M., May, C., Bennett, D., Sharpe, P.T. & Anderson, D.C. (1992). Detection of canine distemper virus in bone cells in the metaphyses of distemper-infected dogs. *Journal of Bone and Mineral Research*, 7(7), 829–834.
- Mee, A.P., Gordon, M.T., May, C., Bennett, D., Anderson, D.C. & Sharpe, P.T. (1993). Canine distemper virus transcripts detected in the bone cells of dogs with metaphyseal osteopathy. *Bone*, 14(1), 59–67.
- Moritz, A & Baumgärtner, W & Frisk, A.-L & König, Matthias. (2003). Sensitivity and specificity of CDV RT-PCR in the diagnosis of canine distemper. *Tierärztliche Praxis Ausgabe K: Kleintiere - Heimtiere*. 31. 60-66.
- Mutinelli, F., Vandeveld, M., Griot, C & Richard, A. (1989). Astrocytic infection in canine distemper virus-induced demyelination. *Acta Neuropathologica*, 77(3), 333–335.
- von Messling, V., Svitek, N. & Cattaneo, R. (2006). Receptor (SLAM [CD150]) recognition and the V protein sustain swift lymphocyte-based invasion of mucosal tissue and lymphatic organs by a morbillivirus. *Journal of Virology*, 80(12), 6084–6092.
- von Messling, V., Zimmer, G., Herrler, G., Haas, L. & Cattaneo, R. (2001). The hemagglutinin of canine distemper virus determines tropism and cytopathogenicity. *Journal of Virology* 75(14), 6418–6427.
- Nishi, T., Tsukiyama-Kohara, K., Togashi, K., Kohriyama, N., Kai, C. (2004). Involvement of apoptosis in syncytial cell death induced by canine distemper virus. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 27(6), 445–455.
- Noyce, R.S., Delpeut, S. & Richardson, C.D. (2013). Dog nectin-4 is an epithelial cell receptor for canine distemper virus that facilitates virus entry and syncytia formation. *Virology* 436(1), 210–220.
- Olsen, P., Klingeborn, B. & Bonnett, B. (1997). Distemper titer study in Sweden 1995-1996. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 11, 148.
- Panzer, Y., Calderón, M.G., Sarute, N., Guasco, S., Cardeillac, A., Bonilla, B., Hernández, M., Francia, L., Bedó, G., La Torre, J. & Pérez, R. (2012). Evidence of two co-circulating genetic lineages of canine distemper virus in South America, *Virus Research*, 163(1), 401–404.

- Pardo, M.C., Bauman, J.E. & Mackowiak, M. (1997). Protection of dogs against canine distemper by vaccination with a canary poxvirus recombinant expressing canine distemper virus fusion and hemagglutinin glycoproteins. *American Journal of Veterinary Research* 58(8), 833–836.
- Park, S., Choi, U.S., Kim, E.J., Lee, J.H., Lee, H.B., Cho, H.S., Kim, W., Lim, C.W. & Kim, B. (2016). Coinfection with Hepatozoon sp. and Canine Distemper Virus in a Yellow-throated Marten (*Martes flavigula koreana*) in Korea. *Journal of Wildlife Diseases*, 52(2), 414–417.
- Pearce-Kelling, S., Mitchell, W.J., Summers, B.A. & Appel, M.J. (1991). Virulent and attenuated canine distemper virus infects multiple dog brain cell types in vitro. *Glia*, 4(4), 408–416.
- Richards, T.R., Whelan, N.C., Pinard, C.L., Alcala, F.C. & Wolfe, K.C. (2011). Optic neuritis caused by canine distemper virus in a Jack Russell terrier. *Canadian Veterinary Journal*, 52(4), 398–402.
- Rima, B.K., Duffy, N. & Mitchell, W.J. (1991). Correlation between humoral immune responses and presence of virus in the CNS in dogs experimentally infected with canine distemper virus. *Archives of Virology*, 121, 1–8.
- Rudd, P.A., Bastien-Hamel, L.É. & von Messling, V. (2010). Acute canine distemper encephalitis is associated with rapid neuronal loss and local immune activation. *Journal of General Virology*, 91(4), 980–989.
- Sanders, V.J., Felisan, S., Waddel, A., Tourtellote, W.W. (1996). Detection of herpesviridae in post-mortem multiple sclerosis brain tissue and controls by polymerase chain reaction. *Journal of neurovirology* 2 (4), 249–258.
- Schultz, R. (2006). Duration of immunity for canine and feline vaccines: A review. *Veterinary Microbiology*, 117(1), 75–79.
- Selby, P.L., Davies, M. & Mee, A.P. (2006). Canine distemper virus induces human osteoclastogenesis through NF- $\kappa$ B and sequestosome 1/P62 activation. *Journal of Bone and Mineral Research*, 21(11), 1750–1756.
- Silva, M.C., Figuera, R.A., Brum, J., Graça, D.L., Kommers, G.D., Irigoyen L.F. & Barros, C.S.L. (2007). Aspectos clinicopatológicos de 620 casos neurológicos de cinomose em cães. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 27(5), 215–220.

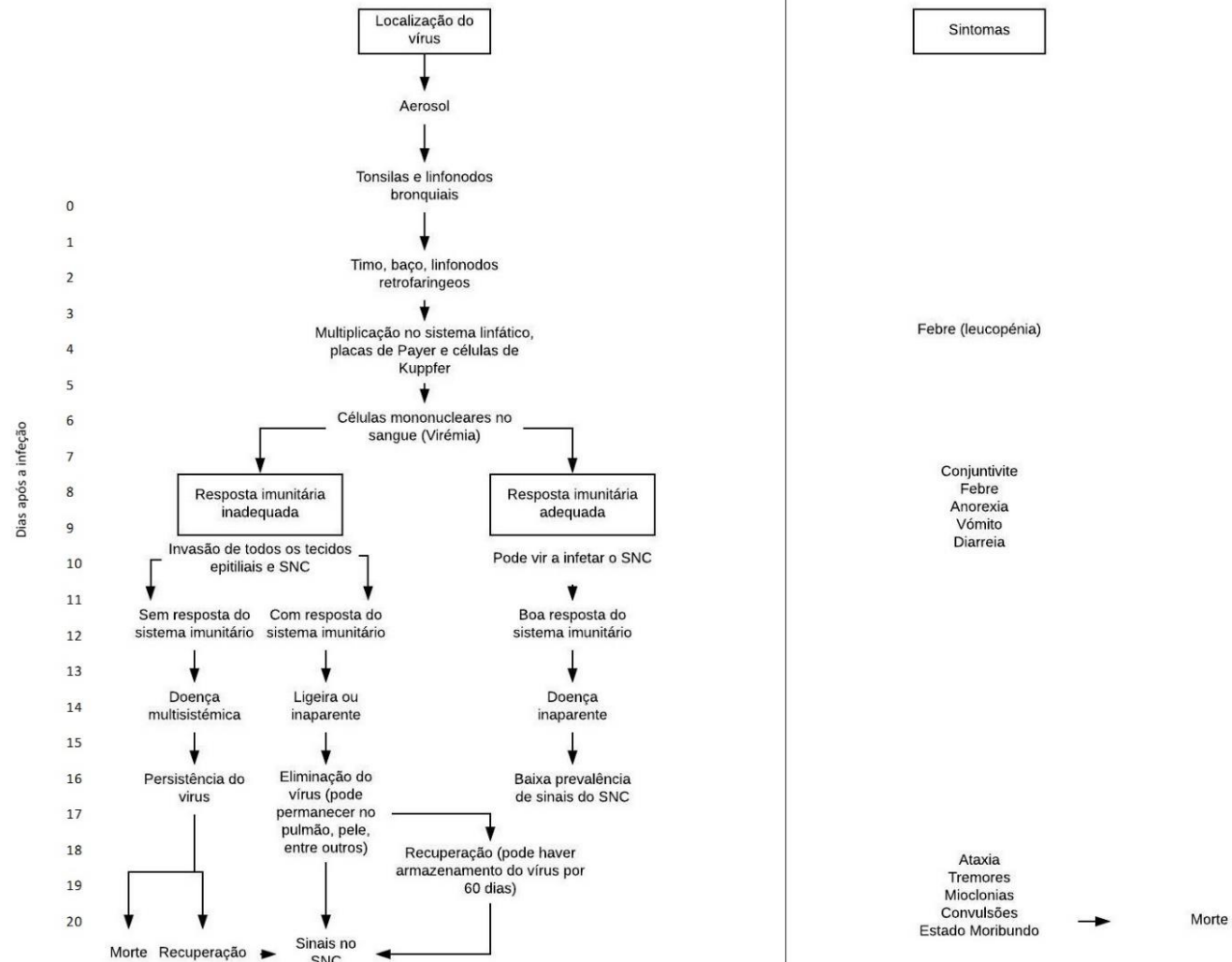
- Sonne, L., Oliveira, E.C., Pescador, C.A., Santos, A.S., Pavarini, S.P., Carissimi, A.S. & Driemeier, D. (2009). Achados patológicos e imuno-histoquímicos em cães infectados naturalmente pelo vírus da cinomose canina. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 29(2),143–149.
- Summers, B.A., Appel, M.J.G. & Greisen, H.A. (1979). Canine distemper encephalomyelitis: Variation with virus strain. *Journal of Comparative Pathology*, 94(1), 65–75.
- Sykes, J. E. (2014) *Canine and feline infectious diseases*. Missouri: Saunders Elsevier Co.
- Vila Nova, A.B.M.M., Cunha, E., Sepúlveda N., Oliveira, M., Braz, B.S., Tavares, L., Almeida, V. & Gil, S. (2018). Evaluation of the humoral immune response induced by vaccination for canine distemper and parvovirus: a pilot study. *BMC Veterinary Research*, 14(1), 348.
- Tipold, A., Vandeveld, M., Wittek, R., Moore, P., Summerfield, A. & Zurbriggen, A. (2001). Partial protection and intrathecal invasion of CD8+ T cells in acute canine distemper virus infection. *Veterinary Microbiology*, 83(3), 189–203.
- Waner, T., Mazar, S. & Keren-Kornblatt, E. (2006). Application of a dot enzyme-linked immunosorbent assay for evaluation of the immune status to canine parvovirus and distemper virus in adult dogs before revaccination. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 18(3), 267–270.
- Wiebe, V. (2015). *Drug therapy for infectious diseases of the dog and cat*. New Jersey: Wiley-Blackwell.
- World Small Animal Veterinary Association (WSAVA). (2016). Guidelines for the vaccination of dogs and cats. *Journal of Small Animal Practice*, 57, 1–45.
- Wünschmann, A., Alldinger, S., Kremmer, E. & Baumgärtner W. (1999). Identification of CD4+ and CD8+ T cell subsets and B cells in the brain of dogs with spontaneous acute, subacute-, and chronic-demyelinating distemper encephalitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 67(2),101–116.
- Zachary, F.J. & McGavin, D.M. (2011). *Pathologic basis of veterinary disease*. Missouri: Saunders Elsevier Co.



Zurbriggen, A., Muller, C. & Vandeveld, M. (1993). In situ hybridization of virulent canine distemper virus in brain tissue using digoxigenin-labeled probes. *American Journal of Veterinary Research*, 54(9), 1457–1461.

## **VIII. Anexos**

## Anexo 1- Fluxograma da infecção pelo CDV



Anexo 2- Formas clínicas de esgana registradas

Nº caso	Diagnóstico	Forma clínica
1	Confirmado	Gastrointestinal
2	Confirmado	Gastrointestinal
3	Confirmado	Gastrointestinal
4	Confirmado	Gastrointestinal
5	Confirmado	Gastrointestinal
6	Confirmado	Gastrointestinal
7	Confirmado	Gastrointestinal
8	Confirmado	Gastrointestinal
9	Confirmado	Neurológica
10	Confirmado	Neurológica
11	Confirmado	Neurológica
12	Confirmado	Neurológica
13	Confirmado	Neurológica
14	Confirmado	Neurológica
15	Confirmado	Neurológica
16	Confirmado	Neurológica
17	Confirmado	Neurológica
18	Confirmado	Neurológica
19	Confirmado	Neurológica
20	Confirmado	Neurológica
21	Confirmado	Neurológica
22	Confirmado	Neurológica
23	Confirmado	Neurológica
24	Confirmado	Respiratória
25	Confirmado	Respiratória
26	Confirmado	Respiratória
27	Confirmado	Respiratória
28	Confirmado	Respiratória
29	Confirmado	Respiratória
30	Suspeito	Gastrointestinal
31	Suspeito	Gastrointestinal
32	Suspeito	Gastrointestinal
33	Suspeito	Gastrointestinal
34	Suspeito	Gastrointestinal
35	Suspeito	Gastrointestinal
36	Suspeito	Neurológica
37	Suspeito	Neurológica
38	Suspeito	Neurológica
39	Suspeito	Neurológica
40	Suspeito	Neurológica
41	Suspeito	Neurológica
42	Suspeito	Neurológica
43	Suspeito	Neurológica
44	Suspeito	Neurológica
45	Suspeito	Neurológica
46	Suspeito	Neurológica
47	Suspeito	Neurológica
48	Suspeito	Respiratória
49	Suspeito	Respiratória

Anexo 3. Valores de hemograma dos cães suspeitos de esgana ou com esgana confirmada internados na UIDI

Caso	Hematócrito (%)	N. não segmentados (/μL)	Neutrófilos segmentados (/μL)	Linfócitos (/μL)	Monócitos (/μL)	Eosinófilos (μL)	Hematócrito (%)	N. não segmentados (/μL)	Neutrófilos segmentados (/μL)	Linfócitos (/μL)	Monócitos (/μL)	Eosinófilos (/μL)
1	30,4	348	6960	870	435	87	51,3	0	4651	551	918	0
2	49,9	0	9990	444	666	0						
3	43,6	0	6095	789	287	0						
4	41,8	0	6922	1236	82	0						
5	37,6	0	10865	2142	1836	459	43,5	506	18737	2785	2785	506
6	60,6	0	13398	2593	1081	4538	45,7	669	13627	1747	874	699
7	31,6	0	10000	1250	1250	0						
8	40,3	0	18984	2373	1898	475						
9	26,7	0	3138	2092	0	0	36,7	0	16896	8184	1320	0
10	23,3	0	7207	1591	562	0	26,4	2145	34749	5148	858	0
11	26,1	1840	12328	3680	184	368	31,5	0	8512	4580	1520	608
12	32,3	7956	40443	5304	12597	0	28	12711	46830	5352	1338	669
13	29,3	0	13500	3600	900	0	29	2968	34768	4240	424	0
14	19,9	0	3132	1188	1080	0	20,9	0	12046	1616	7365	294
15	38,2	0	3120	624	1040	416						
16	30,8	0	6026	581	653	0	32,6	0	759	1012	759	0
17	48,6	0	4845	1098	323	129						
18	32	0	17388	2277	414	624						
19	52,6	0	5312	1703	477	0						
20	46,7	476	7973	2737	714	0	41,2	0	4978	2040	571	571
21	30,9	0	6820	2420	330	1100						
22	31	0	225	515	1456	0	44,3	0	12384	1296	720	0
23	32,8	0	20430	1135	454	681						
24	44,3	0	17044	4396	2442	488						
25	47,5	0	4250	1020	2550	680						
26	41,2	0	7360	1656	184	0						
27	38,9	0	14190	1650	660	0						
28	39,2	0	18095	3055	2350	0						
29	53,3	0	15390	1368	342	0						